

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Саратовский национальный исследовательский
государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

На правах рукописи

Тучина Дарья Кирилловна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ДИФФУЗИИ ХИМИЧЕСКИХ АГЕНТОВ
В БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЯХ ОПТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ
В НОРМЕ И ПРИ МОДЕЛЬНОМ ДИАБЕТЕ**

Специальность 03.01.02 – биофизика

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
кандидат физико-математических наук
Башкатов Алексей Николаевич

Саратов 2016

Оглавление

Введение	4
Глава 1. Структура и оптические свойства здоровых и диабетических биологических тканей. Оптическое просветление биологических тканей	10
1.1 Структура и оптические свойства биологических тканей.....	10
1.1.1 Структура и оптические свойства кожи.....	11
1.1.2 Структура и оптические свойства мышечной ткани.....	17
1.1.3 Структура и оптические свойства сердечной мышечной ткани.....	20
1.1.4 Структура и оптические свойства тканей с патологиями, связанными с развитием сахарного диабета. Гликирование белков	22
1.2 Диффузия гиперосмотических химических агентов в биологических тканях. Оптическое просветление биологических тканей.....	26
1.3 Выводы.....	32
Глава 2. Исследование диффузии гиперосмотических химических агентов в коже <i>ex vivo</i> и сердечной мышечной ткани <i>in vitro</i>	34
2.1 Материалы и методы	34
2.1.1 Исследуемые образцы и оптические просветляющие агенты	34
2.1.2 Экспериментальная установка и методы измерения.....	37
2.1.3 Измерение геометрических параметров образцов при оптическом просветлении.....	39
2.1.4 Метод определения коэффициентов диффузии гиперосмотических химических агентов в биологических тканях <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i>	42
2.2 Результаты и обсуждение.....	47
2.2.1 Исследование кинетики изменения геометрических свойств биотканей при оптическом просветлении гиперосмотическими химическими агентами.....	47
2.2.2 Определение коэффициентов диффузии глюкозы и глицерина в сердечной мышечной ткани <i>in vitro</i>	57
2.2.3 Определение коэффициентов диффузии гиперосмотических химических агентов в коже <i>ex vivo</i>	62
2.3 Основные результаты исследований.....	68

Глава 3. Исследование диффузии глюкозы в нативной и диабетической коже <i>ex vivo</i> при использовании растворов глюкозы разной концентрации.....	70
3.1 Материалы и методы	70
3.1.1 Исследуемые образы и оптические просветляющие агенты.....	70
3.1.2 Экспериментальная модель сахарного диабета	71
3.1.3 Экспериментальная установка и метод измерения	72
3.1.4 Измерение геометрических параметров нативной кожи при оптическом просветлении растворами глюкозы разной концентрации.....	72
3.2 Результаты и обсуждение	74
3.3 Основные результаты исследований	83
Глава 4. Исследование диффузии глицерина в нативной и диабетической коже и сердечной мышечной ткани <i>ex vivo</i>.....	85
4.1. Материалы и методы	85
4.2. Результаты и обсуждение.....	85
4.3 Основные результаты исследований	90
Глава 5. Исследование диффузии гиперосмотических химических агентов в коже <i>in vivo</i>	92
5.1 Материалы и методы.....	92
5.1.1 Оптические просветляющие агенты.....	92
5.1.2 Экспериментальная установка и метод измерения.....	93
5.2 Метод определения коэффициентов диффузии гиперосмотических химических агентов в биологических тканях <i>in vivo</i>	93
5.3 Результаты и обсуждение.....	94
5.4 Основные результаты исследований.....	97
Заключение и основные результаты	99
Список литературы.....	101

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Сахарный диабет – эндокринное заболевание, для которого характерно повышенное содержание глюкозы в организме. По данным всемирной организации здравоохранения в 2012 - 2013 годах диабет стал причиной приблизительно пяти миллионов смертей, что сделало его восьмой по значимости причиной смерти во всем мире. К 2030 году прогнозируется увеличение количества смертей примерно на 50% и перемещение сахарного диабета на седьмое место [1, 2]. Основные осложнения при заболевании сахарным диабетом связаны с гликированием белков - результатом взаимодействия молекул глюкозы с белками. Так как белки составляют значительную часть многих биотканей, то их гликирование приводит к изменению структуры тканей, ограничению их функционирования [3-7], метаболическому дисбалансу и, в конечном итоге к нарушению работы органов [8]. В силу того, что структура биотканей определяет во многом их оптические свойства, становится возможным осуществление мониторинга этих изменений структуры ткани оптическими методами.

С целью определения степени гликированности белков ранее были выполнены исследования флуоресцентных свойств гликированного гемоглобина и различных биотканей [4, 6, 9-13]. Исследовались модифицированные в результате гликирования стенки сосудов [14], преломляющие свойства эритроцитов здоровых и больных диабетом пациентов [5], оптические свойства кожи больных страдающих диабетом [15]. Многочисленные работы посвящены исследованию содержания свободной глюкозы в крови, внутритканевой жидкости (ВТЖ), и других жидкостях тела [16-19, 21-25], разработкам методов мониторинга диабета, основанных на различии оптических свойств здоровых и диабетических биотканей [3-8, 16, 26].

Анализ литературы показывает, что изучение гликированных биологических тканей является востребованным и перспективным научным направлением. Поскольку проницаемость биоткани для химических агентов определяется структурой ткани, которая может изменяться в результате протекания патологических процессов, таких как гликирование, то характер и скорость диффузии агента в биотканях будет отражать изменение их структуры, что может быть использовано в качестве биомаркера степени гликированности биоткани.

Метод «оптического просветления» биологических тканей [16, 26], в котором снижение рассеяния света во времени определяется скоростью диффузии химических агентов, так называемых оптических просветляющих агентов (ОПА), в тканях, может быть использован для количественного определения этой скорости. Хорошо известно, что биоткани обладают достаточно сильным светорассеянием в видимом и ближнем ИК-диапазоне вследствие неоднородностей показателя преломления на границах клеточных органелл, липидных капель,

мембран и белковых волокнистых структур, составляющих ткани, что и определяет относительно неглубокое проникновение света в ткань с перераспределением падающих пучков света по всем направлениям. Введение в биоткань биосовместимых иммерсионных жидкостей и частичное замещение ими ВТЖ приводит к выравниванию показателей преломления компонентов ткани, и, следовательно, к снижению рассеяния биоткани, что является одним из основных механизмов оптического просветления дисперсных сред, включая биоткани.

К сожалению, в настоящее время в литературе недостаточно данных о процессах диффузии иммерсионных жидкостей в диабетических тканях. Помимо этого, недостаточно исследована и диффузия некоторых иммерсионных жидкостей в коже и миокарде, что само по себе представляет интерес для развития методов оптической томографии, микроскопии высокого разрешения и оптимизации методов целевого воздействия на тканевые структуры, включая злокачественные новообразования. Решение вышеобозначенных проблем и вопросов актуально, что и определило цель настоящей диссертационной работы.

Целью диссертационной работы является экспериментальное исследование диффузии химических агентов в здоровых и диабетических биотканях с помощью оптических методов мониторинга.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Исследование кинетики оптического просветления диабетических и недиабетических биологических тканей *in vitro* и *ex vivo* под действием различных биосовместимых гиперосмотических иммерсионных агентов.
2. Исследование геометрических изменений образцов биологических тканей при оптическом просветлении *in vitro*.
3. Определение коэффициентов диффузии гиперосмотических иммерсионных агентов в диабетических и недиабетических биологических тканях, таких как кожа и сердечная мышечная ткань, из измерений кинетики их оптического просветления.
4. Сравнительный анализ оптических и диффузионных свойств диабетических и недиабетических биологических тканей *ex vivo*.
5. Исследование оптического просветления кожи *in vivo* под действием различных биосовместимых гиперосмотических иммерсионных агентов. Определение коэффициентов диффузии иммерсионных агентов в коже *in vivo*.

Объекты исследования

Исследования с участием лабораторных животных проходили с соблюдением необходимых нормативных актов (Хельсинкской декларации 2000 г. о гуманном отношении к животным и «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977)). Получена рекомендация комитета по этике ГБОУ ВПО «Саратовский Государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ по протоколу №6 от 1.03.2016 года.

Исследования с участием добровольцев проводились с их согласия на основании Федерального закона Российской Федерации и Хельсинкской декларации о надлежащей клинической практике. Получена рекомендация комитета по этике ФГБОУ ВО «Саратовский Государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ по протоколу №1 от 13.09.2016 года.

Научная новизна работы

1. Исследована кинетика изменения оптического коллимированного пропускания, веса, толщины и площади образцов сердечной мышечной ткани свиньи *ex vivo* во время их оптического просветления растворами глюкозы и глицерина.
2. Впервые измерены коэффициенты диффузии глюкозы и глицерина в сердечной мышечной ткани свиньи *ex vivo*.
3. Исследована кинетика изменения оптического коллимированного пропускания, веса, толщины и площади образцов кожи крысы *ex vivo* во время их оптического просветления растворами глюкозы, ПЭГ-300, ПЭГ-400, рассчитаны коэффициенты диффузии глюкозы, ПЭГ-300, ПЭГ-400, йогексола (Омнипак®) в коже крысы *ex vivo*.
4. Исследована кинетика изменения веса, толщины и площади образцов кожи мыши *ex vivo* во время их оптического просветления растворами глюкозы разной концентрации.
5. Исследовано изменение кинетики оптического коллимированного пропускания во время оптического просветления кожи *ex vivo* здоровых мышей (с нормальным уровнем глюкозы в крови) и мышей с привитым аллоксановым диабетом растворами глюкозы разной концентрации. Измерены коэффициенты диффузии иммерсионных агентов в диабетической и недиабетической коже *ex vivo*. Показано, что коэффициент диффузии глюкозы существенно меньше в диабетической коже по сравнению со здоровой.
6. Исследовано изменение кинетики оптического коллимированного пропускания во время оптического просветления кожи и сердечной мышечной ткани *ex vivo* крыс с привитым аллоксановым диабетом и крыс контрольной группы водным раствором глицерина. Рассчитаны коэффициенты диффузии глицерина в диабетической и недиабетической коже и

сердечной мышечной ткани *ex vivo*. Показано, что диффузия глицерина затруднена в диабетической коже и сердечной мышечной ткани по сравнению со здоровыми тканями. Впервые обнаружена корреляция в поведении оптического просветления и диффузии молекул глицерина для миокарда и кожи крысы.

7. С помощью оптической когерентной томографии исследовано оптическое просветление кожи человека *in vivo* под действием различных биосовместимых гиперосмотических двух- и многокомпонентных растворов: водного 40%-раствора глюкозы, раствора фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%), водного 60%-раствора глицерина, раствора глицерина (50%) в воде (40%) и ДМСО (10%), рентгеноконтрастного раствора «Омнипак» (Йогексола). Определены коэффициенты диффузии химических агентов в коже человека *in vivo*.

Научная и практическая значимость работы

Результаты работы дают основания для дальнейших научных исследований диффузионных свойств ОПА в различных биологических тканях при диабете. По полученным результатам подана заявка на патент №2016102046 от 22.01.2016 на изобретение «Способ для неинвазивного оптического мониторинга патологии тканей жизненно важных органов при сахарном диабете и биосенсор для его реализации». Данные исследования могут способствовать созданию неинвазивного метода мониторинга ранних диабетических изменений в тканях организма. Измеренные коэффициенты проницаемости и скорость диффузии химических агентов в исследованных биотканях могут дать информацию о степени их гликированности, что позволит экстраполировать наличие патологических изменений в недоступных для прямого анализа биологических тканях (тканях почки, ретине, миокарде, скелетных мышцах, тканях мозга и пр.), осуществить мониторинг патологических нарушений при развитии сахарного диабета, определять стадию заболевания и состояние организма при лечении заболевания на длительном интервале времени.

Результаты также способствуют дальнейшему развитию метода оптического просветления биотканей, применяемого для управления оптическими параметрами тканей для повышения эффективности диагностики и терапии различных заболеваний оптическими методами.

Основные результаты и положения, выносимые на защиту:

1. Модифицированная методика определения коэффициентов диффузии иммерсионных жидкостей в биологических тканях *in vitro*, основанная на измерении временных зависимостей коллимированного пропускания образцов и математической модели, учитывающей изменение показателя преломления компонентов ткани, изменение

геометрических параметров исследуемых образцов (толщины, площади), вызванных сжатием или набуханием ткани. Значения коэффициентов диффузии глюкозы и глицерина в сердечной мышце свиньи, а также глюкозы, глицерина, ПЭГ-300, ПЭГ-400 и йогексола (Омнипак®) в коже крысы.

2. Для аллоксановой модели диабета у мышей в экспериментах *ex vivo* установлено, что при воздействии водных 30%-, 43%-, 56%-растворов глюкозы на кожу коэффициент диффузии глюкозы в коже в 1.5-2.5 раза меньше, чем у мышей контрольной группы. Установлено, что при воздействии 70%-раствора глицерина на кожу и сердечную мышцу крыс *ex vivo* коэффициент диффузии глицерина в биотканях в 1.2 и 1.5 раза меньше, соответственно, чем у крыс контрольной группы.
3. Воздействие рентгеноконтрастного раствора «Омнипак» (йогексола) на кожу человека *in vivo* вызывает эффект оптического просветления кожи. Значения коэффициентов диффузии глюкозы, глицерина, йогексола (Омнипак®) в коже человека *in vivo*.

Личный вклад автора диссертации

Автор лично участвовал в проведении всех экспериментальных исследований, обработке полученных данных, анализе и обсуждении полученных результатов, в написании научных статей и апробации результатов исследований на конференциях, симпозиумах.

Достоверность научных результатов

Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных, использованием апробированных моделей и методов измерения, согласованностью с результатами независимых исследований других авторов, широкой апробацией результатов.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на 17 международных и российских мероприятиях, в том числе: на XVI, XVII, XVIII, XIX, XX международных школах для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике «Saratov Fall Meeting - SFM» (Саратов, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016), Russian-Chinese Workshop on Biophotonics and Biomedical Optics (Саратов, 2012), Asia Communications and Photonics Conference (Китай, 2012), The National Biophotonics and Imaging Platform Ireland (Ирландия, 2013), The 11th International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine (Китай, 2013), The 5th Biophotonics and Imaging Graduate Summer School (Ирландия, 2014), ежегодной всероссийской научной школе-семинаре «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине» (Саратов, 2014), ежегодной

всероссийской молодежной Самарской конкурс-конференции научных работ по оптике и лазерной физике (Самара, 2014, 2015), всероссийской научной школе-семинаре «Взаимодействие СВЧ, терагерцового и оптического излучения с полупроводниковыми микро- и наноструктурами, метаматериалами и биообъектами» (Саратов, 2015), всероссийской молодежной научной школе-конференции «Практическая биофизика» (Саратов, 2015), 3 летней школе «Фотоника встречает биологию» (Греция, 2015), International Symposium “Fundamentals of Laser Assisted Micro- and Nanotechnologies” (FLAMN-16), Saint-Petersburg, Russia, June 27- July 01, 2016.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 17 работ, из которых 8 – в реферируемых изданиях, 2 научных статьи – в рецензируемых журналах из списка ВАК, 7 статей в трудах российских и международных конференций.

Конкурсная поддержка работы

Исследования были поддержаны грантами Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ НШ-1177.2012.2, НШ-703.2014.2, НШ-7898.2016.2; грантами РФФИ 13-02-91176-ГФЕН_а, № 14-02-00526-14; грантами РНФ №14-15-00186, №14-15-00128; грантом Правительства РФ №14.Z50.31.0004, программой «УМНИК» (договор №4247ГУ1/2014 от 16.12.2014 г., №9084ГУ2/2015 от 24.12.2015 г.).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения и списка цитируемой литературы, состоящего из 276 наименования. Диссертация изложена на 121 странице, содержит 25 рисунков, 23 таблицы, 38 формул.

Работа выполнена на кафедре оптики и биофотоники ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им.Н.Г.Чернышевского». Результаты, представленные в главе 4 были получены в лаборатории им. Бриттона Чанса Хуажонгского университета науки и технологии (г. Ухань, Китай) (международный договор между СГУ им. Н.Г. Чернышевского и Хуажонг университетом науки и технологий в г. Ухань, Китай).

Глава 1. Структура и оптические свойства здоровых и диабетических биологических тканей. Оптическое просветление биологических тканей

1.1 Структура и оптические свойства биологических тканей

Оптические методы диагностики и лечения биологических тканей становятся все более распространенными и широко применяются в биологии и медицине. Безопасность этих методов и возможность неинвазивно получить ряд параметров в режиме реального времени объясняет распространение оптических методов и расширение сферы их применения в медицине [16, 26-31]. С помощью оптического излучения можно получать информацию о структуре, составе и свойствах биологических тканей, изучать процессы, которые происходят в них, не оказывая негативного воздействия на биоткани [32]. Существенным преимуществом диагностических и фототерапевтических методов, которые используют излучение видимого и ближнего ИК-диапазона, является способность излучения этих диапазонов достаточно глубоко проникать в биологические ткани. Диапазон длин волн оптического излучения от 600 до 2500 нм включает в себя четыре «окна прозрачности» - диапазоны, в которых ослабление света биологическими тканями минимально. Так как биологические ткани содержат большое количество воды, спектральные «окна прозрачности» соответствуют диапазонам длин волн, где поглощение воды минимально. Первое «терапевтическое окно прозрачности» включает в себя длины волн от 650 до 950 нм, где поглощение воды относительно слабое, однако имеет место поглощение света гемоглобином. Второе «окно прозрачности» располагается между двумя максимумами поглощения воды на длинах волн от 1100 до 1350 нм, третье «окно прозрачности» имеет диапазон от 1600 до 1870 нм, и четвертое – от 2100 до 2300 нм хорошо подходит для изучения коллагеносодержащих тканей [33-36].

Так как биологические ткани имеют сложную структуру, представляющую собой комплексы различных веществ, волокон и внутритканевой жидкости, они представляют собой оптически неоднородные среды [33]. В свою очередь, неоднородность среды приводит к рассеянию падающего на нее света, поэтому биологические ткани обладают сильным рассеянием [33, 37, 38]. Средний показатель преломления биотканей выше, чем у воздуха ($n_{\text{возд}} = 1$), поэтому свет, падающий на биоткань отражается на границе воздух-биоткань – френелевское отражение. Неотраженный свет проникает внутрь биоткани, где многократно рассеивается и поглощается по причине вариации показателя преломления внутри биоткани. В зависимости от оптических свойств биоткани, т.е. от содержащихся в ней компонентов, свет определенных длин волн сильнее или слабее поглощается и рассеивается, распространяясь в биологической ткани [33].

В результате поглощения энергия света превращается в тепло, используется на фотохимические процессы, либо испускается в виде флуоресценции. Коэффициенты поглощения биотканей принимают значения в диапазоне 10^{-2} - 10^4 см⁻¹. Свет ультрафиолетового (УФ) (длиной волны менее 400 нм) и инфракрасного (ИК) (длиной волны более 2000 нм) диапазонов не проникает глубоко в ткань ввиду сильного поглощения биотканью. Свет видимого диапазона длин волн, рассеиваясь и поглощаясь, проникает в биологические ткани на глубину приблизительно 0.5-2.5 мм, от 15% до 40% излучения, падающего на биоткань, диффузно отражается. Излучение диапазона 600-1600 нм может проникать в биоткань на глубину до 8-10 мм, так как в данном случае рассеяние выше поглощения. Диффузное отражение света увеличивается до 35-70% в зависимости от интенсивности падающего света в результате рассеяния назад [33, 39].

Таким образом, облучая биологическую ткань, а затем регистрируя обратно рассеянное или прошедшее через биоткань излучение, можно определить спектр поглощения биоткани и сделать выводы о структуре и составе биологической ткани [37].

1.1.1 Структура и оптические свойства кожи

Кожа относится к соединительной ткани, имеет сложную неоднородную клеточно-волоконистую структуру, которая является причиной высокого светорассеяния биоткани. Она включает в себя три основных слоя: эпидермис, дерма и подкожно-жировая клетчатка [26, 33, 40-45]. Эпидермис отделен от дермы эпидермальной базальной мембраной [43, 44]. Эпидермис является внешним слоем кожи и выполняет защитную функцию – предотвращает проникновение инородных веществ и повреждение организма. У взрослого человека площадь эпидермиса колеблется в диапазоне от 1.5 до 2 м², масса составляет приблизительно 0.5 кг. Толщина эпидермиса в разных областях тела разная. На плече, предплечье, бедре, груди, шее толщина эпидермиса составляет 0.02-0.05 мм, на подошвах ног, ладонях, то есть в местах более значительной физической нагрузки толщина увеличивается до 0.5—2.4 мм. Эпидермис включает в себя пять слоев: роговой, блестящий, зернистый, шиповидный и базальный слои [41-46].

Роговой слой состоит из чешуек и имеет толщину 8-15 мкм, на ладонях и подошвах ног может достигать 600 мкм. Длина чешуек не превышает 10 мкм, а их толщина – составляет 70-100 нм. Чешуйки состоят из кератиновых фибрилл диаметром 7-8 нм и аморфного вещества, покрыты однослойной оболочкой толщиной 12-15 нм. Со временем происходит обновление роговых чешуек – отторжение старых и образование новых. Кератин является основным белком

эпидермиса, стоек по отношению к механическим воздействиям, он составляет 50% рогового слоя.

Зернистый слой эпидермиса включает от 1 до 4 рядов клеток. Зернистые клетки отличаются меньшим содержанием митохондрий. Митохондрии представляют собой органеллы, состоящие из матрикса, окруженного внутренней мембраной, межмембранного пространства и гладкой внешней мембраны, их основной функцией является синтез АТФ. Цитоплазма клеток содержит кератогиалиновые массы, ассоциированные с тонофибрилярно-кератогиалиновыми комплексами, а также кератиносомы. Тонофибрилярно-кератогиалиновые комплексы являются предшественниками кератиновых фибрилл рогового слоя. Толщина слоя составляет 3 мкм [41, 42].

Шиповидный слой содержит шиповатые эпидермоциты, которые составляют основную массу клеток эпидермиса. Эпидермоциты покрыты плазмолеммой (толщиной 7-8 нм), которая имеет неровную форму ввиду наличия выростов (шипов), которые проникают в углубления соседних клеток. Оболочки клеток соединены посредством уплотнений плазмолемм – десмосом. В базальном слое содержатся тонофибриллы диаметром 7-10 нм. Толщина шиповидного слоя может составлять от 50 до 150 мкм [41, 42].

Базальный слой содержит базальные эпидермоциты, имеющие округлую форму и соединенные меньшим количеством десмосом. В самом глубоком слое эпидермиса, прилежащем к дерме - базальном слое, происходит деление клеток, которые затем продвигаются к поверхности эпидермиса, обеспечивая смену клеток всех слоев. Полное обновление клеток эпидермиса происходит за 26-28 дней. В базальном слое синтезируется фибриллярный белок, полисахариды и липиды, содержатся меланоциты [41, 42].

Помимо механической защиты эпидермис осуществляет иммунную защиту. Для осуществления барьерной функции в эпидермисе, а точнее, в базальном слое содержатся клетки Лангерганса, меланоциты и кератиноциты. При механическом повреждении, воспалительном процессе в коже кератиноциты вырабатывают вещества, необходимые для иммунного ответа кожи. Дендритные клетки Лангерганса происходят из костного мозга и составляют 2-7% в суспензии эпидермальных клеток. Клетки Лангерганса активируются иммунным механизмом, мигрируют в лимфатические узлы, перенося антигены и сигнализируя об опасности [41-45, 47].

Клетка меланоцита находится в базальном слое, либо немного сдвинута в сторону дермы, однако отростки клетки могут достигать до шиповидного и зернистого слоя. Меланоциты образуют меланосомы и синтезируют пигмент меланин. При воздействии ультрафиолетового излучения на кожу повышается выработка меланина, следовательно, кожа становится темнее. Таким образом, пигментированная кожа осуществляет защиту организма от УФ лучей [41, 42].

Большую часть кожи занимает дерма, которая в основном состоит из коллагеновых (70% сухого веса кожи), эластических волокон, упакованных в пучки, и внутритканевой жидкости, которая содержит протеогликаны, белки, воду и полисахаридные-белковые комплексы [26, 33, 40-45, 48]. Толщина дермы составляет 1.0-1.5 мм, а в некоторых местах достигает 2.5-3 мм [45, 46]. Дерма обеспечивает прочность, эластичность и упругость кожи, защищая организм от внешних физических воздействий. В дерме располагаются лимфатические и кровеносные сосуды, нервные волокна, сальные и потовые железы, волосяные фолликулы. Нервная система регулирует скорость деления клеток в коже [42]. Дерма включает в себя два слоя: сосочковый, расположенный ближе к поверхности кожи и более глубокий сетчатый слой. Сосочковый слой содержит более тонкие фибриллярные сети, которые уплотняются в сетчатом слое [43, 44].

Коллагеновые волокна состоят из вытянутых белковых молекул (фибрилл) коллагена – тропоколлагена. В тропоколлагене глицин составляет 1/3 всех его аминокислотных остатков, 1/3 занимают пролин и 4-гидроксипролин. Тропоколлаген включает в себя три полипептидные цепи одного размера, которые образуют спираль. Тройная спираль стабилизируется с помощью многочисленных межцепочечных поперечных сшивок между гидроксизиновыми и лизиновыми остатками. Каждая полипептидная цепь тропоколлагена содержит около 1000 аминокислотных остатков. Цепи и спирали молекул фибрилл связываются через основания Шиффа, образуя коллаген [40, 48]. Диаметр коллагеновых волокон составляет 40-150 нм [42, 49], волокна формируют пучки, состоящие из 20-30 фибрилл, диаметр такого пучка составляет 0.5-2 мкм. Параллельные пучки фибрилл образуют волокно, диаметр которого может достигать 30 мкм. Пучки фибрилл, связанные между собой отдельными волокнами или пучками фибрилл, объединяются в коллагеновый пучок, средний диаметр которого составляет 100-200 мкм. С возрастом толщина коллагеновых пучков увеличивается. Коллаген не растворяется в воде [42], показатель преломления сухого коллагена равен 1.54 [50], пленок сухого коллагена 1 типа – 1.53 [51]. Показатель преломления волокон коллагена сухого деминерализированного сухожилия принимает значения в диапазоне 1.32-1.45 (осевой градиент) и 1.40-1.61 (радиальный градиент). Показатель преломления коллагеновых волокон роговицы глаза человека и животных был получен в среднем равным 1.41 [52].

Нужно отметить, что показатель преломления вещества, в данном случае биологической ткани и ее компонентов, зависит от длины волны излучения, что важно учитывать в расчетах и построении моделей тканей [53-58].

Эластические волокна оплетают коллагеновые волокна, не сплетаясь в пучки. Волокна окружает аморфное (основное) вещество. Диаметр эластических фибрилл составляет 7-25 нм [41, 42]. Основным белковым компонентом эластических волокон является эластин. И эластин, и коллаген содержат большое количество глицина и пролина. Отличается эластин от коллагена

химическим составом и молекулярной структурой. По сравнению с коллагеном эластин содержит значительно больше аланина и валина, но меньше аргинина и глутаминовой кислоты. Характерная особенность эластина - малое содержание полярных аминокислотных остатков [40, 48].

Аморфное вещество имеет консистенцию геля, содержит различные вещества, которые поступают в него из крови (воду, сахара, белки крови), продукты метаболизма дермальных и эпидермальных клеток (протеогликаны, гликопротеины, белки). Протеогликаны, состоящие из полисахаридов и белков, связывают воду [42, 48].

Основными клеточными компонентами дермы являются фибропласты. Фибропласты синтезируют фибриллярный белок коллаген, эластин и протеогликаны [41, 42]. Протеогликаны представляют собой высокомолекулярные углеводно-белковые соединения, образующие межклеточный матрикс соединительной ткани [40, 42]. Углеводными остатками протеогликанов являются полисахаридные цепи – гликозаминогликаны. Одним из представителей гликозаминогликанов является гиалуроновая кислота, основная функция которой заключается в связывании воды. Функции связывания воды и регуляции процессов диффузии зависят от свойств глюкозамингликанов, входящих в состав протеогликанов. Синтез гиалуроновой кислоты и глюкозамина, которые входят в состав гиалуроновой кислоты, происходит из D-глюкозы [40].

Вода играет важную роль в поддержании структуры и механических свойств кожи, во взаимодействии белков кожи [17], а также во многом определяет скорость диффузии оптического просветляющего агента (ОПА) в биотканях [59, 60]. В молодой коже большинство молекул воды связано с белками - «связанная» вода. Молекулы воды, которые не связаны с белками, связаны друг с другом, образуя структуру тетраэдра (так называемая "слабо-связанная" вода). Некоторое количество воды в коже находится в свободном состоянии, это так называемая "свободная" вода. Содержание свободной воды зависит от физиологического/патологического состояния кожи, влажности окружающей среды и увлажнения кожи химическими агентами [61-63]. Связанная вода может быть преобразована в свободную воду при сжатии и интенсивном испарении воды (дегидратации) с поверхности кожи [64-66]. Конфокальная комбинационная микроскопия позволяет определить распределение воды по глубине кожи *in vivo* [67, 68]. В роговом слое кожи человека содержится 40-45% воды (%-масса), в более глубоких слоях живого эпидермиса и дермы эта цифра постепенно увеличивается до 65-70% [67]. Общее содержание воды в коже крысы составляет 54% [69]. В коже человека содержание воды составляет 62-71%, а это 6-8% воды всего организма [42]. Количество свободной/слабо-связанной воды в коже можно оценить как 38-44% [70].

Поглощением воды определяются поглощающие свойства кожи в спектральном диапазоне ближней ИК области [16, 26, 27]. Ближняя ИК спектроскопия использовалась для количественного определения содержания связанной и слабо-связанной воды в коже [71], общее содержание воды в коже мышей оценивали с помощью ИК спектроскопии как $\sim 70\%$ [72]. В кожу вода в основном поступает из кровеносных сосудов, ее содержание контролируется нервной системой. Водно-солевой баланс важен для протекания различных реакций в коже [42].

Дерма кожи хорошо снабжается кровью, в ней находится широкоплетистая сеть мелких артерий, которые выполняют теплообменную функцию [41, 42]. В крови содержатся эритроциты – клетки, содержащие пигмент гемоглобин, который обеспечивает организм кислородом [41]. Поглощение окси- и дезоксигемоглобина обеспечивает поглощение кожи в видимом диапазоне длин волн [26, 41]. Двумя другими основными поглотителями света видимого диапазона в коже являются меланин и бета-каротин, который содержится в основном в эпидермисе [32, 41, 73]. Помимо кровеносной, дерма содержит лимфатическую и нервную сети, которые участвуют в обмене веществ, защите от инфекций и передаче сигналов головному мозгу соответственно [42].

В дерме иммунную функцию выполняют тучные клетки, располагающиеся в верхних слоях дермы и вокруг кровеносных сосудов. Они накапливают гепарин, гистамин, серотонин, АТФ, гиалуроиновою кислоту, фактор-активатор тромбоцитов, вырабатываемые при физиологических и патологических процессах. При высвобождении гистамина и серотонина из тучных клеток повышается проницаемость микрососудов кожи, обеспечивая, таким образом, поступление лейкоцитов и антител в поврежденную зону [42]. Плотность кожи принимает значения в диапазоне $1.07-1.2 \text{ г/см}^3$ [74-77].

Плохая проницаемость кожи является одним из механизмов защитной функции организма от неблагоприятного воздействия внешней среды. Кератиновые чешуйки, липиды эпидермиса и кожное сало препятствуют проникновению инородных веществ в кожу и смачиванию кожи жидкостями. Таким образом, кожа практически непроницаема для жидкостей и твердых тел, но при длительном контакте с веществом кожа способна его пропустить. Наиболее способны к проникновению через кожу вещества, которые растворимы в воде и липидах. Через защитный барьер могут проникать вещества, растворяющие жиры, например, эфиры и спирты. Что касается воды, она также способна проникать из внешней среды во внутренние слои кожи, однако, гораздо легче проходит обратный процесс, т.е. имеет место трансэпидермальная потеря воды [42].

Поглощение кожи в видимом и ближнем ИК диапазоне незначительно по сравнению с рассеянием. Коэффициент поглощения эпидермиса варьируется от 19 до 66 см^{-1} в диапазоне длин волн от 415 до 1570 нм, дермы – от 0.24 до 8.5 см^{-1} в диапазоне длин волн от 420 до 1370

нм [33, 78-81]. Коэффициент рассеяния эпидермиса и дермы в диапазоне длин волн от 415 до 800 нм принимает значения от 420 до 800 см⁻¹ и от 175 до 320 см⁻¹, соответственно [33]. Фактор анизотропии рассеяния обоих слоев кожи равен 0.74-0.85 на длинах волн от 415 до 800 нм [33]. Плотность рассеивателей и межклеточной жидкости кожи были получены равными $\rho_s = 1.41$ г/мл [82, 83] и $\rho_{ICF} \approx 1$ г/мл [74], соответственно.

В таблице 1 представлены литературные данные по измеренным показателям преломления кожи и ее отдельных слоев человека и животных. Показатель преломления кожи, полученный путем усреднения значений показателей преломления, найденных в литературе, равен 1.420 ± 0.060 .

Таблица 1. Показатели преломления слоев кожи человека и животных

Биологическая ткань	Показатель преломления	Длина волны, нм	Метод измерения	Источник
Роговой слой человека <i>in vivo</i>	1.500 ± 0.020	815	Бифокальная оптическая когерентная рефрактометрия	84
	1.510 ± 0.020	1300	ОКТ	33, 85
	1.470 ± 0.010	1300	ОКТ	86
Роговой слой человека	1.550	400-700	-	33, 87
Эпидермис человека <i>in vivo</i>	1.340 ± 0.010	1300	ОКТ	85
	1.360 ± 0.010	1300	ОКТ	86
Дерма человека <i>in vivo</i>	1.430 ± 0.020	1300	ОКТ	86
	1.410 ± 0.020			
Дерма человека <i>in vitro</i>	1.400 ± 0.007	1300	ОКТ	85
	1.410 ± 0.030	1300	ОКТ	85
Дерма свиньи <i>in vitro</i>	$1.382 \pm 0.005i$	632.8	Отражающая эллипсометрия	88
Дерма свиньи	1.393	325	Призмный лазерный рефрактометр	33
	1.376	442		
	1.359	532		
	1.354	633		
	1.364	850		
	1.360	1064		

	1.357	1310		
	1.361	1557		
Кожа человека <i>in vivo</i>	1.520	550	Метод критического угла	89
	1.530	632.8	Внутреннее отражение	90
Кожа курицы <i>in vitro</i>	1.424±0.022	1310	Низкокогерентная интерферометрия	91
Дерма	1.410 1.430	1300	ОКТ	33

1.1.2. Структура и оптические свойства мышечной ткани

Мышцы выполняют двигательную функцию. У взрослого человека общая мышечная масса составляет приблизительно 40% от массы всего тела [40, 92], с возрастом она снижается до 25-30% [92]. Существует три типа мышечной ткани: скелетная, гладкая и сердечная. Различают также гладкие и поперечно-полосатые мышцы. К поперечно-полосатым относят скелетные мышцы, мышцы языка, мышцы верхней трети пищевода, внешние мышцы глазного яблока и другие [40].

Гладкие мышцы состоят из веретеновидных клеток длиной 40-200 мкм и толщиной 4-20 мкм с ядрами в центре [93].

Поперечно-полосатые мышцы состоят из мышечных волокон, которые сплетены в пучки различного диаметра [40, 92]. Белки - актин и миозин образуют вытянутые тонкие (диаметр 8 нм) и толстые (диаметр 12–16 нм, длина приблизительно 1.5 мкм) нити - миофиламенты. Толстые миофиламенты уложены в форме шестиугольника диаметром 40–50 нм [40]. Миофиламенты в свою очередь образуют миофибриллы – нитевидные пучки толщиной менее 1 мкм, образующие мышечные волокна и покрытые эластичной оболочкой – сарколеммой [93, 94, 113]. Миофибриллы отвечают за сокращение мышечных клеток [93]. Диаметр поперечно-полосатого мышечного волокна составляет 10-100 мкм, его длина соответствует длине мышцы (до 15 см) [93, 94]. Ядра располагаются непосредственно под поверхностью клеток в направлении длинной оси мышечного волокна [93].

Поперечная исчерченность мышечных волокон зависит от оптической неоднородности белковых веществ, входящих в состав волокон [94]. Миофибриллы создают продольные полосы мышцы. Поперечные полосы создаются за счет чередования светлых и темных областей миофибрилл. Темные анизотропные диски образованы миозиновыми нитями, светлые изотропные диски – актиновыми нитями. Участок, включающий в себя по одному светлому и темному диску, называется саркомером. В зависимости от функций и состава мышечных

волокон различают красные и белые мышечные волокна. Красные мышечные волокна отличаются высоким содержанием миоглобина и митохондрий и работоспособны длительное время. Белые мышечные волокна содержат больше миофибрилл и способны на сильную, но недолговременную работу [93].

Каждое мышечное волокно покрыто плазматической мембраной, называемой сарколеммой. Цитоплазма мышечных клеток и волокон называется саркоплазмой. В саркоплазме мышечных волокон находятся также митохондрии, микросомы, рибосомы, трубочки и цистерны саркоплазматической сети, вакуоли, гликоген, липиды, запасующие энергию, и т.д. [94].

В мышцах животных и человека содержится 72-80% воды [40, 95], остальная масса состоит практически полностью из белков, также в мышечной ткани присутствуют гликоген, другие углеводы, липиды, азотсодержащие вещества, соли неорганических и органических кислот и др. [40]. В работе [96] было определено, что приблизительно 60% от общей массы мышц составляет свободная вода, соответственно около 16% - связанная вода.

Белки мышечной ткани разделяют на три группы, которые отличаются растворимостью в воде: миофибриллярные (45% от всего мышечного белка), саркоплазматические (35%) и белки стромы (20%). Миозин и актин являются миофибриллярными белками, которые участвуют в сократительных процессах и составляют большую часть сухого остатка миофибрилл - 50-55% и 20% от сухой массы миофибрилл, соответственно. Молекула миозина имеет длину 150 нм. К саркоплазматическим белкам относят белки-ферменты, участвующие в окислительном фосфорелировании, тканевом дыхании, дыхательный пигмент – миоглобин. Белками стромы в поперечно-полосатой мускулатуре являются коллаген и эластин. В скелетных мышцах присутствуют адениновые кислоты (АТФ, АДФ) и другие азотсодержащие вещества, гликоген, свободная глюкоза, разнообразные микроэлементы [40]. Плотность скелетной мышечной ткани равна 1.06 г/см^3 [97].

В видимом и ближнем ИК диапазоне поглощение мышечной ткани мало по сравнению с рассеянием, также как и у кожи. Коэффициент поглощения мышцы меняется от 0.09 до 2.3 см^{-1} на длинах волн от 450 до 1000 нм. Коэффициент рассеяния мышц в диапазоне длин волн 500-800 нм принимает значения от 66.7 до 239 см^{-1} . Фактор анизотропии рассеяния мышц варьируется от 0.73 до 0.97 на длинах волн 500-800 нм [33, 98].

В таблице 2 приведены литературные данные по показателям преломления мышечной ткани человека и животных. Показатель преломления мышцы, полученный путем усреднения значений показателей преломления значений, найденных в литературе, составил 1.400 ± 0.330 .

Показатель преломления и объемная доля саркоплазмы в мышечной ткани были рассчитаны R.C. Haskell и соавт. [99] равными 1.350 и 0.875, соответственно, эффективный показатель преломления белков мышечной ткани – 1.530.

Таблица 2. Показатели преломления мышцы человека и животных

Биологическая ткань	Показатель преломления	Длина волны, нм	Метод измерения	Источник
Мышца человека	1.370	456-1064	-	33, 100
Мышца быка	1.412±0.006	632.8	Волоконно-оптический рефрактометр	101
	1.382±0.004	592	Флуоресцентная конфокальная микроскопия	102
	1.377±0.003 1.414±0.003	650	Полное внутреннее отражение	103
	1.382±0.004	592	Флуоресцентная конфокальная микроскопия	33, 102
Мышца свиньи	1.402±0.002 1.399±0.002	488	Полное внутреннее отражение	33, 104
	1.381±0.002 1.379±0.002	632.8		
	1.370±0.002 1.372±0.003	1079.5		
	1.367±0.002 1.370±0.003	1341.4		
	1.380±0.007 1.460±0.008	632.8	Полное внутреннее отражение	105
	1.381 1.410	632.8	Полное внутреннее отражение	106
	1.387±0.005 1.418±0.003	650	Полное внутреннее отражение	103
	1.371	632.8	Полная внутренняя	88

			эллипсометрия	
	1.364±0.001	632.8	Зеркальное отражение	107
Мышца крысы	1.3980	589	Рефрактометр Аббе	108
	1.398	589	Рефрактометр Аббе	33
	1.399			
	1.410			
	1.420			
	1.429			
	1.441			
	1.452			
	1.464			
	1.478			
	1.491			
	1.503			
Мышца мыши	1.400 ± 0.010	445	Полное внутреннее отражение	109
	1.380 ± 0.020	535		
	1.380 ± 0.020	680		
	1.370 ± 0.020	1000		
Мышца курицы	1.399±0.013	1310	Низкокогерентная интерферометрия	91
Мышца собаки	1.400	632.8	Волоконно-оптический рефрактометр	33, 101
	1.404±0.003 1.402±0.002	488	Полное внутреннее отражение	33, 104
Мышца овцы	1.389±0.002	632.8	Полное внутреннее отражение	33, 104
	1.378±0.004 1.375±0.003	1079.5		
	1.375±0.003	1341.4		
	1.373±0.003			

1.1.3 Структура и оптические свойства сердечной мышечной ткани

Миокард (сердечная мышца) относится к поперечно-полосатой мускулатуре, но по ряду признаков и содержащимся в нем химическим соединениям он занимает промежуточное

положение между гладкими и поперечно-полосатыми мышцами. В сердечной мышце, а особенно в гладких мышцах значительно меньше миофибриллярных белков, чем в скелетной мышце.

Концентрация белков стромы в миокарде и в гладких мышцах выше, чем в скелетной мускулатуре. По содержанию АТФ и гликогена сердечная мышца занимает промежуточное положение между гладкой и скелетной мышечной тканью [40].

Миокард - средний слой стенки сердца, образованный поперечно-полосатой мышечной тканью и состоящий из соединенных между собой кардиомиоцитов – клеток мышечной ткани. Кардиомиоциты связаны в волокна, которые образуют узкопетлистую сеть, которая обеспечивает сердечное сокращение [92]. Сарколемма представляет собой клеточную мембрану мышечных волокон, заполненную внутриклеточной жидкостью. В ней содержится белок миоглобин, который связывается с молекулами кислорода, диффундирующими из внутритканевой жидкости в мышечные волокна. Миоглобин является главным поглотителем света в мышцах. Максимальные полосы поглощения миоглобина у лошадей и китов находятся на 435 нм, 560 нм [110] и 434 нм, 556 нм [111, 112], соответственно. Саркоплазма сердечной мышцы, как и в скелетных мышцах, состоит из миофибрилл. Диаметр миофибрилл составляет 0.5-2 мкм, то есть размеры, сопоставимые с длинами волн видимого и ближнего инфракрасного диапазона, что говорит о преобладании рассеяния Ми при распространении света этих диапазонов в миокарде. Миофибриллы в основном состоят из белковых нитей-миофиламентов - актина и миозина (диаметр 6-15 нм) и митохондрий (диаметр 1-2 мкм). Миозин сердечной и гладкой мышц заметно отличаются от соответствующих белков скелетных мышц по физико-химическим свойствам. Саркоплазма содержит большое количество гликосом - гранул, содержащих гликоген. Саркоплазма миокарда и гладких мышц содержит больше миоальбумина, чем саркоплазма скелетной мускулатуры. Сложная волокнистая структура миокарда вызывает сильное рассеяние света [33, 40, 110, 111, 113-117]. Общее содержание воды в миокарде крысы составляет приблизительно 70%, из которых около 63% - свободная вода, 9% - связанная вода [118]. Общее содержание воды в миокарде собаки было определено как 77% [119]. Плотность ткани миокарда собаки, соответствующая также плотности сердечной мышечной ткани крысы, морской свинки, кролика и кошки - 1.06 г/мл [119].

Коэффициент поглощения миокарда в области 1060-1064 нм равен 0.3-1.4 см⁻¹. Коэффициент рассеяния миокарда на длинах волн 1060 нм и 1064 нм принимает значения 177.7 и 324 см⁻¹. Фактор анизотропии рассеяния миокарда равен 0.96 на длинах волн 1060 и 1064 нм [33].

В таблице 3 представлены литературные данные полученных показателей преломления мышечной ткани человека. Показатель преломления мышцы, полученный путем усреднения значений показателей преломления значений, найденных в литературе, составил 1.381 ± 0.001 .

Таблица 3. Показатели преломления сердечной мышцы человека

Биологическая ткань	Показатель преломления	Длина волны, нм	Метод измерения	Источник
Сердечная мышца человека <i>in vitro</i>	1.382 ± 0.007	1300	ОКТ	85
Миокард человека	1.380	456-1064	-	33, 100

1.1.4 Структура и оптические свойства тканей с патологиями, связанными с развитием сахарного диабета. Гликирование белков

С возрастом происходит снижение содержания воды в коже и, соответственно, изменение соотношения основного вещества и волокон. Коэффициент соотношения уменьшается за счет увеличения содержания коллагена и снижения концентрации гликозаминогликанов. Значительно уменьшается содержание гиалуроновой кислоты. Происходит изменение физико-химических свойств коллагена: увеличивается число и прочность меж- и внутримолекулярных поперечных связей, снижается эластичность и способность к набуханию, развивается резистентность к коллагеназе, повышается структурная стабильность коллагеновых волокон - прогрессирует процесс созревания фибриллярных структур соединительной ткани. Старение коллагена происходит в результате метаболических процессов, протекающих в организме и оказывающих влияние на молекулярную структуру коллагена. При поражениях соединительной ткани происходит повреждение всех структурных частей ткани: волокон, межклеточного вещества, клеток [40].

Глюкоза играет важную роль в функционировании живого организма, ее основной задачей является доставка энергии. Для регулирования метаболизма глюкозы в поджелудочной железе бета-клетками вырабатывается пептидный гормон инсулин. Если длительное время наблюдается избыток глюкозы в крови (гипергликемия), это приводит к увеличению уровня глюкозы во ВТЖ, что связано с развитием сахарного диабета [120-122]. Причиной заболевания

сахарным диабетом является либо недостаточная производительность поджелудочной железой инсулина (тип I, инсулинозависимый), либо нарушение реакции клеток организма на производимый инсулин (тип II, инсулиннезависимый). В 2012 и в 2013 годах диабет стал причиной от 1.5 до 5.1 миллионов смертей, что сделало его 8 причиной смерти во всем мире [1], к 2030 году прогнозируется перемещение сахарного диабета на 7 место [2]. Одна треть всех больных диабетом имеют осложнения в виде поражений кожи, наиболее тяжелые из них – это хронические язвы, которые плохо заживают и, следовательно, возникает риск занесения инфекций [43]. Одним из частых осложнений заболевания является ретинопатия, которая влечет за собой ослабление и потерю зрения [123, 124]. Было спрогнозировано увеличение числа больных сахарным диабетом во всем мире на 54% к 2030 году по сравнению числом больных в 2010 году [125].

Так как уровень глюкозы в крови связан с ее уровнем в ВТЖ, гипергликемия способствует метаболическому дисбалансу и нарушению работы органов [8, 126]. К примеру, снижение выработки инсулина при сахарном диабете приводит к нарушению поглощения глюкозы мышечными клетками, что приводит к мышечной дисфункции и снижению мышечной массы [127]. В связи с этим достаточно много работ посвящено определению концентрации свободной глюкозы в крови, ВТЖ, и других жидкостях тела [16, 18-25, 128, 129], выявлению морфологических изменений в жизненно важных органах [123, 124, 126], проектированию биосенсоров для непрерывного контроля свободной глюкозы в организме [16, 130], исследованию воздействия глюкозы на кровь и белки биотканей, разработкам методов мониторинга диабета, основанных на отличии оптических свойств здоровых и диабетических биотканей [3-8, 16, 26], оценке скорости диффузии глюкозы в здоровых [16, 26, 27, 59, 60, 131-133] и патологических биотканях - атеросклеротических сосудах [27, 134] и раковой ткани [135].

Основные осложнения заболевания сахарным диабетом связаны с гликированием белков. Гликирование является результатом взаимодействия молекул глюкозы с белками, что приводит к изменению структуры белка и ограничению функционирования биоткани [3-6]. Известно, что гликирование белков инициируется неферментативной реакцией между аминок группой белка и карбонильной группой сахара и соответственно сшивкой между белками [4, 7, 8]. Результатом гликирования является реакция Майяра [136], которая включает в себя два этапа. В результате взаимодействия белка с глюкозой через аддукты основания Шиффа формируется стабильный продукт Амадори. При дальнейшей инкубации продукт Амадори преобразуется в конечный продукт гликирования (КПГ) [8, 137]. Точные механизмы гликирования коллагена пока неясны из-за сложных процессов, сопровождающих реакции [4, 7, 11, 137, 138]. Но два КПГ уже определены: N(ε)-карбоксиметиллизин (КМЛ) и пентозидин. КМЛ и пентозидин накапливаются

в коллагене кожи с возрастом и при сахарном диабете. Пентозидин является флуоресцентной молекулой и может быть обнаружен с помощью флуоресцентных методов анализа [7, 10, 11, 137].

Структурное изменение молекулы белка влияет на его оптические свойства. Так как высокий уровень глюкозы в крови приводит к повышению ее уровня во ВТЖ, гликирование может происходить не только с белками крови, такими как альбумин и гемоглобин, но также и с другими белками тканей организма. На основе исследования флуоресцентных свойств КПП гемоглобина, кожи, роговицы, аорты, суставного хряща [4, 6, 10-12, 139], было обнаружено, что гликирование способствует повышению интенсивности флуоресценции биотканей [4, 10-13, 139] и снижению интенсивности генерации второй гармоники (ГВГ) [17, 63]. Оптоакустическая спектроскопия использовалась для исследования КПП в коже при гликировании *in vitro*. Условия физиологической гипергликемии были обеспечены с помощью иммерсии образцов свиной кожи в растворе рибозы в течение 17 дней. В результате наблюдалось увеличение интенсивности оптоакустического сигнала со временем инкубации и максимальное поглощение света гликированной кожей в диапазоне длин волн 540-620 нм [139].

Возможно, что увеличение интенсивности оптоакустического сигнала с ростом степени гликированности кожи связано не только с высоким поглощением света гликированной кожей (в диапазоне длин волн 540-620 нм), но и с повышенной эффективностью преобразования света в звук за счет большей упругости ткани из-за образующихся сшивок между волокнами.

Было показано, что гликирование стенок сосудов приводит к образованию сшивок у белков сосудистых стенок [14]. Наблюдается существенное отличие преломляющих свойств эритроцитов у здоровых и больных диабетом пациентов [5], а также, что коэффициент отражения кожи больного диабетом различается в зависимости от степени структурных изменений, вызванных гликированием [15]. Показана возможность применения спектроскопии комбинационного рассеяния для определения гликированности гемоглобина [140].

К сожалению выводы, сделанные из различных исследований структуры кожи, часто носят достаточно противоречивый характер [43]. Так в работах [141, 143] было показано уменьшение гидратации рогового слоя кожи человека и мышей *in vivo* при развитии сахарного диабета, причем снижение содержания воды в роговом слое не связано с нарушением барьерных функций эпидермиса. Также было отмечено, что при сахарном диабете не увеличивается трансэпидермальная потеря воды [141, 142]. Однако, в работе [143] утверждается, что длительная гипергликемия нарушает барьерную функцию кожи, ее проницаемость.

У мышей с моделированным сахарным диабетом было отмечено снижение профиликации кератиноцитов в эпидермисе [43, 142, 144], в то время как в работах [143, 144]

подобных изменений не наблюдалось при проведении исследований на крысах и мышах другого возраста. Также противоречивые результаты получены после исследования толщины эпидермиса при диабете [43]. В некоторых работах говорится о том, что толщина эпидермиса не изменяется [143-145] при развитии длительной гипергликемии у крыс, сахарного диабета у мышей и людей, в других утверждается, что толщина уменьшается [142, 144, 146] при использовании других моделей сахарного диабета или животных другого возраста, также сообщается об увеличении толщины эпидермиса [147]. В работе [144] различные выводы могли быть вызваны разным возрастом мышей, на которых проводились исследования. Противоречивые результаты могли быть получены ввиду использования различных моделей сахарного диабета. Изменение распределения коллагена в дерме наблюдали с помощью гистологии и микроскопии у больных диабетом, имеющих осложнения, в отличие от тех больных, у которых не было выявлено осложнений [148].

In vitro исследования гликирования белков ткани и крови путем инкубации в растворах рибозы [4, 149], или глюкозы [150, 151] показывают достаточно эффективное гликирование белков в течение 10-11 дней инкубации. Исследования коллагена IV типа плаценты человека [149], коллагена бычьей кожи [4], и гемоглобина [150, 151] представлены в литературе.

Белки являются основными компонентами многих биотканей, гликирование белков приводит к значительному изменению структуры тканей [4, 7]. Поскольку проницаемость биоткани для ОПА и метаболитических веществ во многом определяется структурой ткани и ее изменениями в результате протекания патологических процессов, таких как гликирование, то изменение скорости диффузии агента (коэффициента диффузии или коэффициента проницаемости) в биоткань на протяжении некоторого временного интервала будет отражать изменение структуры биоткани, и, таким образом может быть использовано в качестве биомаркера степени гликированности биоткани. Так как все жизненно важные органы, такие как миокард, сетчатка глаза, ткани головного мозга хорошо снабжаются кровью, т.е. в том числе и глюкозой, то у больных сахарным диабетом они подвергаются гликированию в первую очередь. К сожалению, проблема неинвазивного мониторинга ранних структурных изменений этих биотканей с помощью оптических методов остается до сих пор не решенной. Так как кожа является поверхностным органом, который может быть легко исследован оптически, а кожа также хорошо снабжается кровью и содержит большое количество белков, то можно предложить мониторинг ранних диабетических изменений в коже человека для предсказания влияния болезни на весь организм, в том числе и на жизненно важные органы.

1.2 Диффузия гиперосмотических химических агентов в биологических тканях. Оптическое просветление биологических тканей

Функциональная визуализация и мониторинг транспорта эндогенных (метаболических) и экзогенных химических веществ в биологических тканях находятся под пристальным вниманием исследователей в течение последних десятилетий [16, 26-31].

Проницаемость биологических тканей для различных агентов исследуется с целью получения информации о механизмах взаимодействия биотканей с различными химическими веществами, в том числе метаболическими молекулами, о транспорте лекарств в биотканях и о влиянии агентов на оптические, диффузионные, морфологические и функциональные свойства биологических тканей [16, 26-28, 96, 131, 152, 153]. Подобная информация необходима при применении различных веществ в фармакологии и косметологии для лечения различных заболеваний, развития неинвазивных оптических методов диагностики и лечения [16, 154, 155], так как скорость действия лекарственных средств определяется в частности и скоростью диффузии лекарственного вещества, с которой молекулы вещества достигают нужной области организма. Разрабатываются методы направленной доставки химических веществ в биоткани, которые направлены на локализацию действия применяемого агента [154, 156], для этого применяются, к примеру, красители [155, 157], флуоресцентные или радиоактивные метки [16, 158]. Для усиления проницаемости тканей для различных веществ разрабатываются многочисленные методы: использование химических усилителей (ДМСО, спирт и др.) [152, 157, 159-162], микроабляции [154, 160, 163, 164], инъекций [154, 156], электрического тока [160], звуковых волн [159, 160], нагрева [160], массажа [159, 165], увеличение температуры ткани [154] и т.д.

Для исследования и оценки проницаемости биологических тканей для химических веществ и скорости диффузии веществ в тканях используются методы, основанные на ядерном магнитном резонансе [16, 158], измерении фотоакустического сигнала [16, 159, 165, 166], спектров и сигналов отражения, пропускания [16, 29, 131, 132, 152, 155, 158, 165, 167-172], флуоресценции [16, 158], комбинационного рассеяния [16].

Коэффициент диффузии характеризует скорость, с которой молекулы растворимого вещества распространяются в среде растворителя [158]. Для описания проницаемости среды для веществ, для расчета коэффициента диффузии химического вещества в среде используются различные математические модели, которые в разной степени учитывают структуру среды (биологической ткани), ее разделение на слои и отдельные компоненты [158, 173, 174]. Теория рассеяния света фиброзными биотканями строится на теории рассеяния света Ми и её приближениях, где волокна ткани представляются в виде рассеивающих цилиндрических

частиц [32, 37, 38]. В основном в математических моделях описывается изменение концентрации химического агента в среде со временем и в пространстве, это описание основывается на законах Фика, из которых следует, что поток вещества пропорционален градиенту его концентрации [155, 157, 158, 161, 173-175, 272]. Рассматриваются как среды конечной толщины, так и полубесконечные среды в зависимости от геометрии среды и эксперимента [16, 158].

Коэффициент проницаемости биологических тканей для химических веществ может быть измерен с помощью оптической когерентной томографии, как отношение толщины исследуемой области ко времени, за которое агент ее проходит [16, 131, 164, 169-172]. Также диффузия веществ в средах рассматривается с точки зрения гидродинамического сопротивления молекулы в среде, броуновского движения молекул растворимого вещества в среде [158], баланса масс [158, 173].

Метод «оптического просветления» (ОП) биологических тканей в основном применяется для снижения светорассеяния в биологических тканях, однако достаточно широко используется и для определения скорости проникновения химических веществ в биоткани [26, 27, 29, 30, 32, 33].

Осмоз – процесс самопроизвольного переноса растворителя через полупроницаемую мембрану в направлении наибольшей концентрации растворенного вещества. В данном случае в качестве полупроницаемой мембраны выступает слой биоткани, в качестве растворителя – вода. Осмотичность (осмолярность) агентов характеризуется способностью вызывать осмос и определяется молярной концентрацией всех осмотически действенных молекул в 1 л воды [32, 33, 176-178]. Осмотичность биологических жидкостей составляет приблизительно 0.3 осмоль/л [179] и увеличивается с ростом концентрации растворенного вещества в растворе [180]. Осмолярность – молярная концентрация всех осмотически действенных молекул в 1 л раствора. Осмотическое давление – давление на раствор, который отделен от растворителя полупроницаемой мембраной, при котором осмос прекращается [178].

Процесс взаимодействия иммерсионного агента с биологической тканью носит сложный характер. С одной стороны, происходит осмотическая дегидратация биоткани, уход межтканевой жидкости из межтканевого и внутриклеточного пространства, с другой стороны, агент диффундирует в биоткань, частично замещая внутритканевую жидкость и цитоплазму, взаимодействуя со структурными компонентами ткани [32, 33]. Диффузия представляет собой процесс самопроизвольного распределения вещества по предоставленному объему [177]. Эти процессы влекут за собой согласование показателей преломления рассеивающих компонентов ткани (волокон, клеточных органелл) и их окружающей среды (ВТЖ, цитоплазмы), изменение упаковки тканевых структур [32, 33]. Таким образом, применение ОПА приводит к снижению

коэффициента рассеяния биоткани и увеличению фактора анизотропии за счет лучшего согласования показателей преломления и упаковки компонентов ткани, отсюда следует увеличение глубины проникновения света в биоткань [16, 26-28], она становится более прозрачной [181].

Дегидратация биоткани, диффузия в нее ОПА, изменение рН среды, в которой находится ткань, могут приводить к ее набуханию или сжатию. Набухание и сжатие ткани возникают по причине изменения расстояния между волокнами, а также из-за изменения диаметра коллагеновых, эластиновых волокон [32, 33]. Можно различать изменение геометрии ткани в разных направлениях. Сжатие/набухание биоткани можно охарактеризовать как «продольное сжатие/набухание» и «поперечное сжатие/набухание», то есть как сжатие/набухание вдоль или поперек волокон биоткани. Уровень рН поверхности кожи принимает значения от 4.8 до 5.9 [182-189]. Уровень рН кожи может изменяться в зависимости от части тела [186, 188-190], возраста [187-189], пола [186, 190], потоотделения [183, 184], времени суток [184, 186], наличия заболеваний [190]. рН сердечной мышцы в среднем - 5.5 [191]. Изменение уровня рН среды, в которой находится ткань, в щелочную или кислотную сторону от изоэлектрической точки белка повышает степень набухания ткани [33].

Технология оптического просветления эффективно использовалась для исследования различных биотканей: кожи [16, 28, 164, 168, 192-200, 247, 276], скелетных мышц [31, 59, 60, 96], твердой мозговой оболочки [132, 202], склеры глаза [26, 27, 167, 170, 203, 204], роговицы глаза [203], желудка [26], молочной железы [169, 205], легких [135], хрящевой ткани [54, 181], сердца [206] и других [16, 26, 27, 181]. В качестве ОПА для оптического просветления биотканей и крови эффективно применяются: глюкоза [16, 26-28, 59, 131, 132, 167, 168, 204], фруктоза [28, 181], рибоза [28], сахароза [207] маннитол [132], глицерин [16, 26-28, 131, 159, 166, 192-194, 202], этиленгликоль [60, 96], полиэтиленгликоль [26, 152, 164, 165, 193, 204], рентгеноконтрастный раствор «Омнипак» (Йогексол) [203, 271], тразограф [204], композиции ОПА и некоторые другие [16, 26, 27, 164, 165]. Часто используются ОПА и химические усилители проницаемости биотканей, такие как ДМСО [42, 152, 194], пропиленгликоль [193] и тиазон [27, 165, 193].

Впервые управление оптическими свойствами клеток с помощью химических веществ было продемонстрировано в работе Барера в 1955 году [29, 201, 208]. С 1991 года эта методика начала широко использоваться для управления оптическими свойствами тканей глаза [29, 201, 209, 210] и в настоящее время развитие методов оптического просветления биотканей получило достаточно широкое распространение. Наиболее известны группы кафедры оптики и биофотоники Саратовского государственного национального исследовательского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского, центра биомедицинской фотоники

имени Бриттона Чанса уханьской национальной лаборатории оптоэлектроники хуажонского университета науки и технологии (г. Ухань, Китай), а также кафедры биомедицинской инженерии университета Хьюстона (Хьюстон, США).

Так как к ОПА предъявляются определенные требования для эффективного и безопасного его применения к биологическим тканям, выбор оптимальной концентрации растворов является достаточно актуальной задачей. Например, растворы глицерина разных концентраций использовались в качестве оптических просветляющих агентов для оптического просветления многих биологических тканей: кожи [172, 194, 198, 200, 211-224], тканей стенки желудка [225], скелетной мышцы [226-228], сухожилия [224, 226, 228], твердой мозговой оболочки [202], тканей зуба [229], тканей груди [169]. В работах [198, 213-216, 220, 225, 227, 228] было выявлено, что с ростом концентрации раствора увеличивается эффективность оптического просветления биотканей. В тоже время, несмотря на сильное оптическое просветление биотканей при воздействии на них сильноконцентрированными растворами глицерина, высокие концентрации могут быть небезопасными для тканей организма, могут помешать восстановлению исходных свойств биоткани после оптического просветления, или даже привести к некрозу при их длительном воздействии на биоткани [214, 225, 227]. Однако после недолговременного (в течение 7 минут) воздействия даже 100%-раствора глицерина на кожу человека *ex vivo* кожа может быть возвращена в первоначальное состояние при ее помещении в физиологический раствор [222]. При нанесении 50%- и 100%-растворов глицерина на твердую мозговую оболочку, 100%-раствор глицерина вызвал более сильную дегидратацию, однако диссоциации коллагена не было выявлено, а после нанесения физиологического раствора на биоткань была подтверждена обратимость процесса дегидратации ткани [202]. При сравнении 50%- и 80%-растворов глицерина в исследованиях по просветлению тканей желудка было показано, что 50%-раствор обладает достаточно большим просветляющим эффектом, хотя 80%-раствор приводит к более сильному просветлению биоткани [225]. В работе [217] после использования 50%-, 60%-, 70%-, 80%- и 90%-растворов глицерина для оптического просветления кожи свиньи *ex vivo* самым эффективным раствором для просветления был определен 70%-раствор глицерина. Несмотря на более высокую концентрацию, 80%- и 90%-растворы показали меньший эффект просветления. В работе [211] 70%- и 100%-растворы глицерина использовались для просветления кожи свиньи *in vitro*. В первые 30 минут 70%-раствор глицерина показывал более сильный эффект просветления, однако через 1 час 100%-раствор показал большую эффективность. Медленное достижение высокой эффективности оптического просветления биотканей концентрированными растворами глицерина (85-100%) может быть связано с их высокой вязкостью (109-1410 мПа·с, $t = 20^{\circ}\text{C}$), вязкость 60-80%-растворов на порядок ниже - 10.8-60.1 мПа·с, для 10-50%-растворов вязкость

снижается еще на порядок и составляет 1.31-6.00 мПа·с [230]. При использовании 40%-, 50%- и 75%-растворов глицерина с ростом концентрации глицерина в растворе был получен усиливающийся эффект просветления кожи *in vivo* вследствие ее дегидратации, однако через 1-2 часа в области исследования возник отек [200, 214], который обусловлен гигроскопичностью глицерина [231]. При использовании растворов глицерина относительно низких концентраций (20%, 30%) не был получен достаточный эффект просветления кожи, действие растворов привело к ее набуханию [200, 214]. Увеличение толщины кожи *in vivo* через 10 минут после инъекции 20%, 30% растворов и уменьшение толщины после инъекции 75% раствора глицерина было определено из гистологических срезов [200]. На изображениях, полученных с помощью микроскопии с использованием второй гармоники, не было обнаружено диссоциации коллагена дермы после 30 минут воздействия 75%-раствора глицерина на кожу. Из изображений, сделанных с помощью электронной микроскопии, получили уменьшение диаметра коллагеновых волокон в дерме [200]. При использовании 100%-глицерина получили увеличение значения фактора анизотропии, что свидетельствует о набухании коллагеновых волокон дермы [194]. При использовании 100%-глицерина определили снижение массы кожи и увеличение объемной доли фибрилл сухожилия [224]. После исследования оптического просветления скелетной мышцы 25%-, 50%- и 75%-растворами глицерина, 50%-раствор был выбран, как оптимальный [226]. Осмотические свойства глицерина позволяют использовать его для перорального лечения повышенного внутриглазного и внутричерепного давления. Было показано, что пероральное введение 57%-раствора глицерина (0.57 г/мл) вызывает увеличение среднего артериального давления и глюкозы в капиллярной крови. Изменение осмолярности плазмы линейно зависит от дозы глицерина. Максимальное увеличение осмолярности плазмы после введения 1.7 г глицерина на 1 кг веса человека составило примерно 8% через 1 час после приема раствора [232].

Из вышеописанного можно сделать следующие выводы. Эффективность оптического просветления биотканей увеличивается с ростом концентрации глицерина в растворе, однако слишком высокие концентрации раствора глицерина (80-100%) могут оказать негативное влияние на биоткань при их длительном применении. Также концентрированные растворы глицерина (85-100%) обладают высокой вязкостью, что замедляет оптическое просветление биотканей, отек биоткани может появиться раньше, чем произойдет ее оптическое просветление. Исходя из этого, приемлемыми для применения к биологическим тканям являются 40-75% водные растворы глицерина, причем 70%-раствор показал хорошую эффективность оптического просветления [211, 217].

Важно отметить, что водные растворы глицерина обладают криопротекторными свойствами для применения к различным типам клеток, тканей и органов в связи с их

способностью ингибировать кристаллизацию льда, которая связана с концентрацией глицерина и водородными связями, образованными этими растворами [86]. Поэтому исследование взаимодействия водных растворов глицерина с биотканями может быть также полезным в области криобиологии.

Благодаря своей эффективности, доступности и биосовместимости полиэтиленгликоль также успешно применяется в качестве ОПА [28, 233-237]. Полиэтиленгликоль (ПЭГ) – полимер этиленгликоля, принадлежащего к классу двухатомных спиртов. В зависимости от молекулярного веса полиэтиленгликоль может быть вязкой жидкостью, гелеобразным или твердым веществом. Например, ПЭГ-300 и ПЭГ-400 являются прозрачными вязкими бесцветными жидкостями с молекулярным весом 300 и 400 дальтон, и обладают сильными гигроскопическими свойствами, ослабевающими с увеличением молекулярного веса [231, 238]. Полиэтиленгликоль активно применяется в медицине и косметологии как основа для мазей, зарегистрирован в качестве пищевой добавки E1521, используется как растворитель, экстрагент, консервант, а также сильный осмотик [238]. Ранее коэффициенты диффузии ПЭГ-300 и ПЭГ-400 были измерены в роговом слое эпидермиса кожи [239], роговице и конъюнктиве глаза [240] и агарозном геле, моделирующем эпителиальную мембрану [241]. Однако, несмотря на достаточно широкое применение ПЭГ как в косметологии, так и в качестве просветляющего агента, анализ доступной нам литературы показывает, что диффузия ПЭГ-300 и ПЭГ-400 в тканях кожи исследована недостаточно [207, 234, 239, 241-242].

Так как метод оптического просветления биологических тканей основан на изменении показателя преломления внутритканевой жидкости, необходимо учитывать показатели преломления биотканей и их компонентов, что также влияет на выбор оптического просветляющего агента. ОПА должен иметь показатель преломления, близкий к показателю преломления рассеивателей биоткани и выше показателя преломления внутритканевой жидкости. Средние значения показателей преломления кожной, мышечной и сердечной мышечной тканей, полученные путем усреднения литературных данных [33, 84-86, 88-91, 101-105, 108], составили 1.417 ± 0.064 , 1.401 ± 0.034 и 1.381 ± 0.001 . Показатель преломления дегидратированных кожи и миокарда человека в работе [243] равен 1.5, мышцы крысы в работе [108] был получен равным 1.584 ± 0.025 .

Для изучения кинетики изменения оптических свойств биотканей при их взаимодействии с ОПА разрабатываются и широко используются различные экспериментальные методы, и в свою очередь технику оптического просветления можно использовать для улучшения различных технологий оптической визуализации, в том числе линейной и многофотонной микроскопии, оптической когерентной томографии и микроскопии за счет увеличения глубины зондирования и повышения пространственного разрешения данных методов [16, 26-28, 33, 131].

Для анализа скорости диффузии ОПА в биологических тканях и эффективности оптического просветления биотканей необходимо создание специальных моделей, которые учитывают структурные и оптические характеристики биологической ткани, а также функции, описывающие процессы, происходящие в ткани [33]. Коэффициент диффузии ОПА в биологической ткани характеризует скорость проникновения молекул ОПА в биоткань, а время диффузии ОПА в биоткань – время оптического просветления биоткани. Время диффузии и коэффициент диффузии характеризуют диффузные свойства биологической ткани для различных химических агентов [33, 96, 158].

При использовании растворов разной концентрации диффузия ОПА в биоткань и дегидратация биоткани вносят разный вклад в оптическое просветление ткани. Было показано [96], что в случае, когда процентное содержание свободной воды в биоткани сопоставимо с процентным содержанием воды в растворе в основном происходит диффузия агента в биоткань, т.е. доминирующим является иммерсионный эффект. При использовании высококонцентрированных растворов происходит сильная дегидратация биоткани ввиду высокого осмотического давления.

Скорость проникновения агента в биоткань и эффективность оптического просветления биоткани могут указывать на наличие в ней патологий, таких как атеросклеротические сосудистые заболевания [27, 134] или рак [27, 84-88, 169-171, 205, 244].

1.3 Выводы

Анализ литературы показывает, что изучение диффузии химических агентов в биологических тканях и влияния сахарного диабета на структурные особенности биологических тканей является перспективным научным направлением. Исходя из многочисленных исследований, можно сделать вывод, что увеличение уровня глюкозы в живом организме вызывает структурные изменения биологических тканей, что должно приводить к изменению диффузионных свойств биотканей. Однако данные о проницаемости биологических тканей в условиях диабета для различных химических агентов отсутствуют в российской и зарубежной литературе, что вызывает необходимость проведения исследований, направленных на изучение диффузионных свойств различных биологических тканей, которые важны для развития оптических методов мониторинга патологий биотканей, вызванных развитием сахарного диабета.

Диффузионные свойства биологических тканей возможно исследовать с помощью метода оптического просветления биологических тканей. Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению диффузии химических агентов в различных биотканях, коэффициенты диффузии некоторых биологически совместимых ОПА в здоровых и

диабетических биотканях не определены. Также мало исследованы эффекты влияния ОПА на геометрические параметры тканей.

Исследование диффузионных свойств здоровых и диабетических биотканей, определение коэффициентов диффузии химических веществ в тканях, исследование изменения геометрических параметров тканей под воздействием химических веществ способствует развитию оптических методов мониторинга патологий биотканей, вызванных развитием сахарного диабета, позволяет расширить возможности использования метода оптического просветления биотканей, улучшить математические модели, описывающие поведение биологических тканей во время их оптического просветления.

Глава 2. Исследование диффузии гиперосмотических химических агентов в коже *ex vivo* и сердечной мышечной ткани *in vitro*

Целью исследования является демонстрация того, что оптическими свойствами сердечной мышцы и кожи можно управлять путем использования различных оптических просветляющих агентов, определение параметров кинетики изменения геометрических параметров биотканей при воздействии на них используемых оптических просветляющих агентов, определение коэффициентов диффузии агентов в биотканях.

2.1 Материалы и методы

2.1.1 Исследуемые образцы и оптические просветляющие агенты

В исследованиях использовались следующие ОПА: 40%-раствор глюкозы ("НовосибХимФарм", Новосибирск, Россия), водный 60%-раствор глицерина, полиэтиленгликоль-300 (ПЭГ-300) (Sigma-Aldrich, Германия), полиэтиленгликоль-400 (ПЭГ-400) (Sigma-Aldrich, Бельгия), «Омнипак[®]» (активное вещество - йогексол) 300 мг йода/мл (Amersham Health, Ирландия).

В таблице 4 приведены значения показателя преломления n на длине волны $\lambda=589$ нм, плотности ρ , вязкости η , осмотического давления P , осмолярности Osm , молекулярной массы Mr , гидродинамического радиуса молекул R_M и pH для ОПА, используемых в исследованиях. Показаны биоткани, которые служили объектами исследований.

Водный 60%-ный раствор глицерина был получен путем смешивания глицерина («База №1 химреактивов», Старая Купавна, Россия) и дистиллированной воды, пропорции рассчитывались по закону Гладстона-Даля для двухкомпонентных растворов [52]:

$$n_{gl_sol} = n_{water} C_{water} + n_{gl} C_{gl}, \quad (1)$$

где n_{gl_sol} - показатель преломления раствора глицерина, n_{water} - показатель преломления воды, C_{water} - объемная доля воды, n_{gl} - показатель преломления глицерина, C_{gl} - объемная доля глицерина.

Таблица 4. Исследуемые биоткани; значения показателей преломления на длине волны 589 нм (n), плотности (ρ), вязкости (η), осмотического давления (P), осмолярности (Osm), молекулярной массы (Mr), гидродинамического радиуса молекул (R_M), pH ОПА, используемых в исследованиях.

Биоткань	ОПА	n	ρ , г/мл	η , сП	P , МПа	Osm , осмоль/л	Mr , Да	R_M , Å	pH
Миокард свиньи <i>in vitro</i>	60%- раствор глицерина	1.414	1.15 (20°C) [231]	11 (20°C) [230, 231]		12.48	92 [231]	2.6- 3.1 [245]	4
	40%- раствор глюкозы	1.391		63 (60 °C) [273]		2.22	198 [231]	3.6 [246]	3
Кожа крысы <i>ex vivo</i>	ПЭГ-300	1.463	1.125 [247]	69 (25°C) [231]	52.78		285-315 [247, 231]		7
	ПЭГ-400	1.465	1.128 [248]	90 (25°C) [231]	44.13		380-420 [248, 231]		7
	Омнипак® (300 мг йода/мл)	1.438		12 (20°C)		0.47			7

Показатели преломления ОПА измерялись на многоволновом рефрактометре Аббе DR-M2/1550 (ATAGO, Япония) на 12-ти длинах волн в диапазоне от 450 до 1550 нм и интерполировались. Результаты измерений представлены в таблице 5.

Таблица 5. Показатели преломления ОПА на разных длинах волн

λ , нм	450	480	486	546	589	644	656	680	930	1100	1300	1550
60%-раствор глицерина	1.4211	1.4203	1.4200	1.4166	1.4140	1.4131	1.4125	1.4107	1.4067	1.4038	1.3971	1.3951
40%-раствор глюкозы	1.3982	1.3956	1.3953	1.3921	1.3909	1.3885	1.3884	1.3869	1.3819	1.3795	1.3736	1.3699
ПЭГ-300	1.4709	1.4685	1.4682	1.465	1.4631	1.4610	1.4604	1.4596	1.4559	1.4544	1.4501	1.4460
ПЭГ-400	1.4733	1.4708	1.4706	1.4670	1.4649	1.4633	1.4627	1.4620	1.4581	1.4567	1.4526	1.4483

Интерполяция выполнялась с использованием соотношения [249]:

$$\frac{n^2 - 1}{n^2 + 1} \frac{1}{\rho^*} = a_0 + a_1 \rho^* + a_2 T^* + a_3 \lambda^{*2} T^* + \frac{a_4}{\lambda^{*2}} + \frac{a_5}{\lambda^{*2} - \lambda_{UV}^{*2}} + \frac{a_6}{\lambda^{*2} - \lambda_{IR}^{*2}} + a_7 \rho^{*2}, \quad (2)$$

где n – показатель преломления ОПА; $\rho^* = \rho/\rho_0$ – относительная плотность просветляющего агента, $\rho_0 = 1$ г/мл; $\lambda^* = \lambda/\lambda_0$ – относительная длина волны, $\lambda_0 = 589$ нм; $\lambda_{UV} = 229.202$ нм; $\lambda_{IR} = 5432.937$ нм; λ – длина волны в нм; $T^* = T/T_0$ – относительная температура просветляющего агента, $T_0 = 273.15$ °К. В таблице 6 приведены коэффициенты интерполяции для используемых ОПА.

Таблица 6. Коэффициенты интерполяции спектральной зависимости показателей преломления ОПА

ОПА	a_0	a_1	a_2	a_3	a_4	a_5	a_6	a_7
60%-раствор глицерина	0.23518	0.02474	-5.44604×10^{-3}	-9.50715×10^{-4}	4.21094×10^{-3}	91.07306	5.1933×10^4	-0.02712
40%-раствор глюкозы	0.23486	0.02446	-5.74523×10^{-3}	-1.00369×10^{-3}	4.32445×10^{-3}	108.29323	6.20682×10^4	-0.03494
ПЭГ-300	0.23858	0.02777	-2.28051×10^{-3}	-6.28375×10^{-4}	4.23549×10^{-3}	-88.63291	-5.08374×10^4	-0.02324
ПЭГ-400	0.23821	0.02743	-2.6284×10^{-3}	-6.05667×10^{-4}	4.28405×10^{-3}	-68.04619	-3.85264×10^4	-0.02098

Спектральные зависимости показателей преломления ОПА использовались в расчетах коэффициентов диффузии ОПА в биологических тканях.

Осмотическое давление ПЭГ-300 и ПЭГ-400 вычислялось с использованием соотношения [250]:

$$P = \alpha C + \beta C^2, \quad (3)$$

где P – осмотическое давление, МПа; C – молярная концентрация, моль/л; для ПЭГ-300: $\alpha = 1.7$, $\beta = 3.3$ и для ПЭГ-400: $\alpha = 1.6$, $\beta = 5.0$. $C_{\text{ПЭГ-300}} = 3.75$ моль/л и $C_{\text{ПЭГ-400}} = 2.815$ моль/литр.

Осмолярность 40%-раствора глюкозы и 60%-раствора глицерина рассчитывалась следующим образом. Молярные концентрации C_M растворов определялись по формуле [177]:

$$C_M = \frac{\rho}{M}, \quad (4)$$

где ρ – плотность раствора, M – молярная масса растворенного вещества.

Для неэлектролитов 1 моль/л равен 1 осмоль/л [178]. В результате осмолярность 40%-раствора глюкозы была получена равной 2.22 осмоль/л, а 60%-раствора глицерина – 12.48

осмоль/л. Таким образом, осмолярность раствора глицерина приблизительно в 5.5 раз выше осмолярности раствора глюкозы.

Уровень pH растворов измерялся с помощью pH-метра-милливольтметра pH-410 («НПО Аквилон», г. Подольск, Россия) с погрешностью прибор ± 0.05 , а также с помощью индикаторной бумаги («Реахим», Россия).

В исследованиях использовались образцы кожи *ex vivo* и миокарда *in vitro*. Образцы кожи *ex vivo* были получены от белых аутбрендных лабораторных крыс. Предварительно шерсть с поверхности кожи удалялась с помощью крема-депилятора «Veet» (Reckitt Benckiser, Франция), после чего обрабатывалась физиологическим раствором для удаления остатков крема с поверхности ткани. С помощью хирургических ножниц вырезались образцы кожи площадью приблизительно $10 \times 15 \text{ мм}^2$. Подкожный жировой слой, препятствующий проникновению гидрофильных веществ в дерму, удалялся. Тонкие образцы миокарда *in vitro* площадью приблизительно $10 \times 15 \text{ мм}^2$ были получены из свежего свиного сердца с помощью скальпеля.

В каждой серии экспериментов использовалось по десять образцов биотканей. В исследованиях использовались двадцать образцов свиного миокарда *in vitro*, десять из которых помещались в 40%-раствор глюкозы ("НовосибХимФарм", Новосибирск, Россия), другие десять образцов - в 60%-раствор глицерина.

Пятьдесят образцов кожи крысы *ex vivo* были разделены на группы, каждая из которой включала в себя по десять образцов. Для каждой группы образцов кожи был выбран оптический просветляющий агент: 40%-раствор глюкозы, 60%-раствор глицерина, ПЭГ-300 и ПЭГ-400, «Омнипак».

2.1.2 Экспериментальная установка и методы измерения

Измерение спектров коллимированного пропускания образцов биотканей проводилось с помощью многоканального спектрометра USB4000-Vis-NIR (Ocean Optics, США). Образец ткани закреплялся на пластиковой пластине размером $3.5 \times 1.5 \text{ см}^2$ с отверстием в центре площадью $8 \times 8 \text{ мм}^2$ и помещался в стеклянную кювету с ОПА объемом 5 мл. Кювета устанавливалась между двумя волоконно-оптическими кабелями P400-1-UV-VIS (Ocean Optics, США) с внутренним диаметром 400 мкм. Для обеспечения коллимированности пучка на торцах волокон с помощью стандартных разъемов SMA-905 закреплялись коллиматоры 74-ACR (Ocean Optics, США). Галогенная лампа HL-2000 (Ocean Optics, США) использовалась в качестве источника излучения. Схема установки представлена на рисунке 1.

Кинетика изменения коллимированного пропускания образца регистрировалась путем последовательной записи спектров коллимированного пропускания в диапазоне 500-900 нм

каждые 2-10 минут в течение 1.5-2 часов. В случае применения «Омнипака» измерения проводились в ближнем ИК спектральном диапазоне 900-2150 нм с помощью спектрометра NIRQUEST 512-2.2 (Ocean Optics, США). Все измерения проводились при комнатной температуре (~ 20°C).

Толщина образцов, помещенных между предметными стеклами, измерялась в пяти точках с помощью микрометра с точностью 5 мкм, после чего значения усреднялись. Вес образцов измерялся до начала и после эксперимента с использованием электронных весов (SCIENTECH, SA210, USA) с точностью 1 мг.

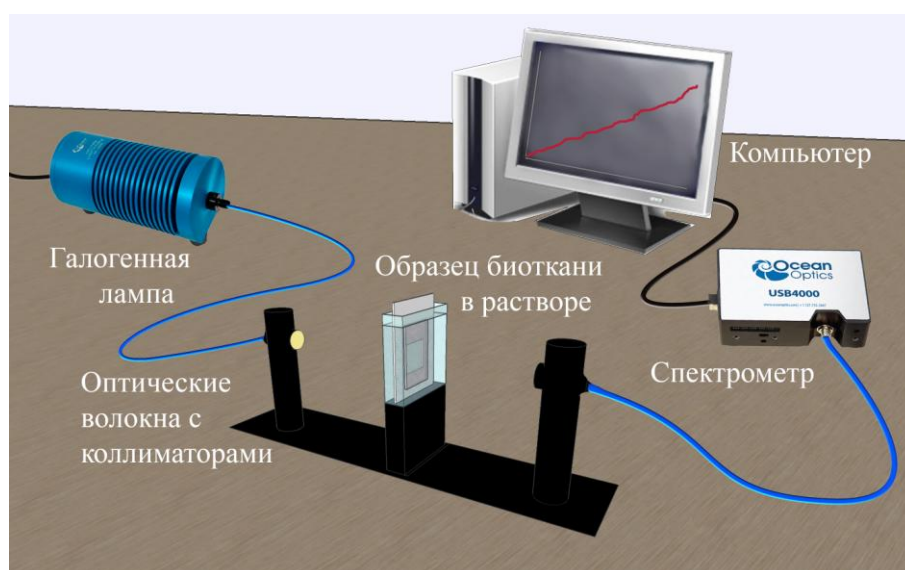


Рисунок 1. Схема экспериментальной установки для измерения коллимированного пропускания образца биоткани, включающая в себя галогенную лампу HL-2000, оптические волокна с коллиматорами, кювету с образцом на пластиковой пластине, погруженной в раствор, многоканальный спектрометр USB4000-VIS-NIR и компьютер

Кинетика коллимированного пропускания кожи была использована для получения коэффициентов (степени) эффективности оптического просветления образцов биотканей, коэффициентов диффузии ОПА в биотканях, коэффициентов проницаемости биологических тканей для ОПА, и характеристического времени диффузии ОПА в ткани.

Характеристическое время диффузии ОПА в ткани τ и максимальное пропускание коллимированного света через образцы биотканей $T_{\max} - T_0$, помещенные в ОПА, определялось путем аппроксимации временных зависимостей коллимированного пропускания образцов биотканей $T(t)$ уравнением:

$$T(t) = (T_{\max} - T_0) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) + T_0 \quad , \quad (5)$$

где T_0 и T_{\max} - начальное и максимальное значение коллимированного пропускания образца биологической ткани.

Степень оптического просветления является одним из важнейших параметров характеризующих сравнительную эффективность различных просветляющих агентов. Степень (эффективность) оптического просветления OC_{eff} образцов биотканей оценивалась как отношение разности между максимальным (T_{\max}) и начальным (T_0) пропусканием к исходному (T_0) пропусканию образца:

$$OC_{eff} = \frac{T_{\max} - T_0}{T_0} \quad (6)$$

Также была произведена оценка степени (эффективности) оптического просветления образцов кожи как отношение разницы между минимальным $\mu_{s\min}$ и начальным μ_{s0} значениями коэффициента рассеяния к начальному μ_{s0} значению коэффициента рассеяния кожи, полученные из значений коллимированного пропускания с помощью закона Бугера-Ламберта:

$$OC_{eff} = \frac{\mu_{s0} - \mu_{s\min}}{\mu_{s0}} \quad (7)$$

Полученные значения степени эффективности ОП усреднялись по длинам волн и исследуемым образцам. Второй способ оценки эффективности ОП (формула 7) дает более точный результат, так как в данном случае учитывается толщина исследуемых образцов.

2.1.3 Измерение геометрических параметров образцов биотканей при оптическом просветлении

Двадцать образцов свиного миокарда *in vitro* использовалось для выявления кинетики изменения их веса, толщины, площади и объема во время иммерсии в 40%-растворе глюкозы и 60%-растворе глицерина.

Сорок образцов кожи *ex vivo*, полученных способом, описанным в пункте 2.1.1 использовалось для исследования кинетики изменения их веса, толщины, площади и объема во время иммерсии в 40%-растворе глюкозы, ПЭГ-300 и ПЭГ-400.

Сначала производились измерения веса и толщины, а также регистрация изображения интактного образца биоткани с помощью цифровой фотокамеры, затем образец помещался в оптический просветляющий агент на 5 минут, после чего вновь производились измерения и запись. Измерения продолжались в течение 2 часов.

Весовые измерения проводились на электронных весах (SCIENTECH, SA210, USA) с точностью 1 мг.

Толщина образцов измерялась микрометром с точностью 5 мкм: каждый образец помещался между двумя предметными стеклами, после чего толщина измерялась в пяти точках, результаты усреднялись.

Для вычисления площади образца его помещали на тест-объект с масштабной линейкой и фотографировали с помощью цифровой камеры. Площадь каждого образца была получена после обработки цифровых изображений. Типичные изображения образца миокарда на всех этапах обработки представлены на рисунке 2. Для оценки площади образца сначала изображение обрабатывалось с помощью функции READ_HLS_HUE программного обеспечения MathCad (Parametric Technology Corporation, США) для разложения полноцветного изображения (рис. 2а) на три компонента: красную, зеленую и синюю (рис. 2б). Медианный фильтр использовался для снижения шума, устранения бликов и т.д. (рисунок 2в). Всем пикселям, которые не были заняты образцом, присваивалось значение 255 (рис. 2г). Вычислялся коэффициент перехода от линейных размеров в пикселях к линейным размерам в миллиметрах, определялся размер всего изображения. Число пикселей, занимаемых образцом (со значениями, отличными от 255), подсчитывалось и переводилось в квадратные миллиметры с помощью следующего уравнения:

$$S = \frac{F(H_s)}{\text{cols}(H_s) \cdot \text{rows}(H_s)} \cdot \frac{\text{rows}(H) \cdot z^2}{\text{cols}(H)}, \quad (8)$$

где F - функция, рассчитывающая число пикселей, занимаемых образцом, cols - количество колонок, rows - количество строк, H - первоначальное изображение, H_s - изображение образца на белом фоне, z - ширина изображения.

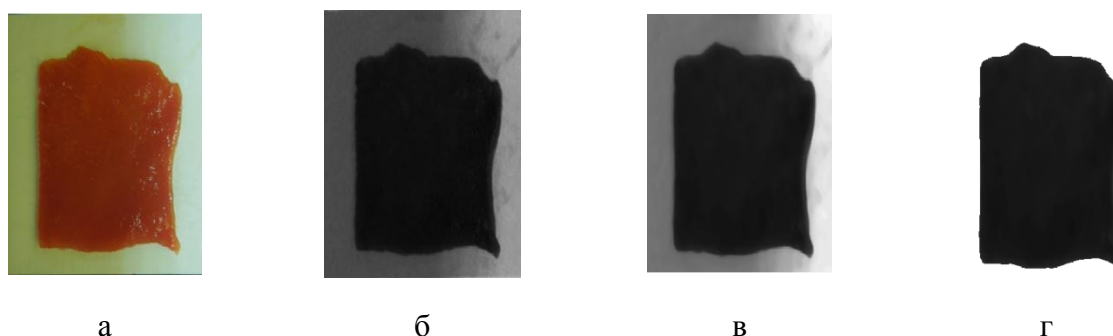


Рисунок 2. Изображение образца миокарда (а), разложенное на оттенки (б), обработанное медианным фильтром (в), результат цифровой обработки изображения (г)

Результатом аппроксимации кинетики изменения веса $w(t)$ образца кожи являются параметры кинетики дегидратации образца, «продольное сжатие» оценивалось из кинетики изменения площади $S(t)$ образца, «поперечное сжатие» - из измерений толщины $l(t)$ образца. Полученные временные зависимости толщины, веса и площади образцов кожи, иммерсированных в ПЭГ-300 и ПЭГ-400, нормировались на значения, измеренные в начальный момент времени, до помещения кожи в растворы, усреднялись по всем образцам, после чего аппроксимировались уравнением:

$$A_{norm}(t) = \frac{A(t)}{A(t=0)} = A_D \exp\left(-\frac{t}{\tau_D}\right) + y_0, \quad (9)$$

где $A_{norm}(t)$ - нормированное значение толщины, площади или веса образца, $A(t=0)$ и $A(t)$ - значение измеренного параметра в начальный момент времени $t=0$ и в момент времени t соответственно, A_D - константа, характеризующая максимальную степень дегидратации/сжатия образца, τ_D - характеристическое время дегидратации/сжатия образца, y_0 характеризует остаточное значение веса, площади, толщины или объема образца после дегидратации.

Поскольку для некоторых иммерсионных агентов после уменьшения измеряемых параметров наблюдается набухание образцов биотканей при их иммерсии в ОПА, уравнение аппроксимации (9) заменялось уравнением (10) которое включает в себя две части, одна из которых представляет собой кинетику дегидратации образца биоткани, а вторая - кинетику набухания образца биоткани. Полученные временные зависимости толщины, веса и площади образцов миокарда, помещенных в 40%-раствор глюкозы и 60%-раствор глицерина, и образцов кожи, иммерсированных в 40%-раствор глюкозы, аппроксимировались уравнением:

$$B_{norm}(t) = \frac{B(t)}{B(t=0)} = A_D \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_w}\right) + B_S \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_g}\right)\right) + y_0, \quad (10)$$

где $B(t)$ и $B(t=0)$ - значение измеренной величины в момент времени t и $t=0$ соответственно, A_D и B_S - максимальная степень дегидратации/сжатия и набухания образца, соответственно, τ_w - характеристическое время диффузии воды, τ_g - характеристическое время диффузии агента, y_0 - наименьшее значение величины, которое может быть достигнуто.

Объем образцов определялся как произведение площади на толщину. Полученные временные зависимости толщины, площади и объема образцов биотканей использовались при оценке коэффициентов диффузии ОПА в биоткань.

2.1.4 Метод определения коэффициентов диффузии гипертонических химических агентов в биологических тканях *in vitro, ex vivo*

Коэффициент диффузии в данном случае представляет собой среднюю скорость обменного потока ОПА в биоткань и воды из биоткани, т.е. относительный коэффициент диффузии. С большой степенью достоверности фиброзные ткани (и в особенности внутритканевый матрикс этих тканей) могут быть представлены как полиэлектролитные гели [40, 82, 191, 251]. В силу этого, описание процесса диффузии может быть выполнено с привлечением хорошо развитого аппарата физической и коллоидной химии [252, 253]. Согласно данному подходу, подвижность молекул в бинарных системах характеризуется парциальными коэффициентами самодиффузии молекул растворителя (в нашем случае воды) и молекул растворенного вещества (ОПА). При этом потоки молекул растворителя и растворенного вещества взаимодействуют друг с другом, и соответствующие коэффициенты диффузии называются связанными друг с другом коэффициентами взаимодиффузии [252, 253]. К сожалению, в настоящее время, не существует надежных методов отдельного измерения этих коэффициентов или они могут быть измерены только в отдельных частных случаях. В этом случае при анализе диффузии высококонцентрированных веществ в биотканях можно говорить об относительном коэффициенте диффузии, характеризующем среднюю скорость обменного потока ОПА в биоткань и воды из биоткани.

Используемый метод оценки коэффициентов диффузии иммерсионных жидкостей в биологические ткани основан на восстановлении значения коэффициента диффузии по кинетике изменения коллимированного пропускания образца биоткани *in vitro*, помещенного в ОПА [16, 26, 132, 254], путем минимизации целевой функции [16, 254, 255]:

$$f(D, t) = \sum_{i=1}^{N_t} (T_c^{teor}(D, t_i) - T_c^{exp}(t_i))^2 \quad (11)$$

где $T_c^{teor}(D, t_i)$ – рассчитанный коэффициент пропускания образца при заданном значении коэффициента диффузии D в момент времени t , сек, $T_c^{exp}(t_i)$ – экспериментально измеренное значение коэффициента пропускания в момент времени t , сек, N_t – количество экспериментальных точек временной зависимости коллимированного пропускания образца биоткани на определенной длине волны.

Для теоретических расчетов кинетики изменения коэффициента коллимированного пропускания образца биологической ткани используется следующий алгоритм, определяющий зависимость коэффициента коллимированного пропускания образца от концентрации ОПА

внутри него. Временная зависимость коллимированного пропускания образца $T_c(t)$ при оптическом просветлении определяется законом Бугера-Ламберта как [16, 132, 254]:

$$T_c^{teor}(\lambda, t) = \exp[-(\mu_a(t) + \mu_s(\lambda, t)) \cdot l(t)], \quad (12)$$

где $\mu_a(\lambda, t)$ и $\mu_s(\lambda, t)$ - кинетика изменения коэффициента поглощения и рассеяния образца биоткани, соответственно, см^{-1} , $l(t)$ - кинетика изменения толщины образца, см, λ - длина волны, нм.

Оптическую модель образца фиброзной биоткани можно представить в виде пластины толщиной l , состоящей из цилиндров, упакованных параллельно плоскостям поверхностей пластины. Цилиндры помещены в базовое вещество, представляющее собой внутритканевую жидкость. Рассеяние света рассматривается в рамках теории Ми [33, 254]. Кинетика изменения коэффициента поглощения биоткани $\mu_a(\lambda, t)$ определялась с помощью уравнения [254]:

$$\mu_a(\lambda, t) = \varphi_s(t) \cdot \sigma_{a0}(\lambda) / \pi a^2, \quad (13)$$

где $\varphi_s(t)$ - кинетика изменения объемной доли рассеивателей биоткани, $\sigma_{a0}(\lambda)$ - поперечное сечение поглощения, см, которое может быть найдено при подстановке начальных (при $t=0$) значений коэффициента поглощения μ_{a0} и объемной доли рассеивателей биоткани φ_{s0} [33, 98, 99], a - радиус волокон-рассеивателей, см.

Экспериментально полученные временные зависимости толщины $l(t)$ и площади $S(t)$ образца использовались для учета изменений его объема $V(t)$ и объемной доли рассеивателей $\varphi_s(t)$ [16, 254]:

$$\varphi_s(t) = \varphi_{s0} V_0 / V(t), \quad (14)$$

где начальный объем образца и кинетика изменения объема вычисляются как $V_0 = S_0 \cdot l_0$ и $V(t) = S(t) \cdot l(t)$, соответственно, S_0 и l_0 - начальные площадь и толщина образца, объемная доля рассеивателей интактного образца $\varphi_{s0} \approx 0.2 - 0.3$ [33, 256, 257].

Коэффициент рассеяния биоткани определяется выражением [16, 26, 254, 258]:

$$\mu_s(\lambda, t) = \frac{\varphi_s(t)}{\pi a^2} \cdot \sigma_s(\lambda, t) \cdot \frac{(1 - \varphi_s(t))^3}{1 + \varphi_s(t)}, \quad (15)$$

где $(1 - \varphi_s(t))^3 / (1 + \varphi_s(t))$ - фактор упаковки рассеивателей, $\sigma_s(\lambda, t)$ - сечение рассеяния частицы, зависящее от времени и длины волны, см и определяющееся по формуле [16, 37, 254]:

$$\sigma_s(\lambda, t) = \frac{\pi^2 a \cdot x^3(\lambda, t)}{8} (m^2(\lambda, t) - 1)^2 \left(1 + \frac{2}{(m^2(\lambda, t) + 1)^2} \right), \quad (16)$$

где $m(\lambda, t) = n_s(\lambda)/n_1(\lambda, t)$ - отношение показателей преломления рассеивающих волокон $n_s(\lambda)$ и окружающей их среды (внутриканевой жидкости) $n_1(\lambda, t)$, $x(\lambda, t) = 2\pi a n_1(\lambda, t)/\lambda$ - относительный размер рассеивателей.

Что касается кожи, ее большую часть по сравнению с другими слоями занимает дерма, поэтому оптические характеристики кожи определяются в основном оптическими свойствами дермы. В данном случае рассеиватели представляют собой коллагеновые волокна. Спектральная зависимость показателя преломления коллагеновых волокон $n_s^{col}(\lambda)$ имеет вид [132, 254]:

$$n_s^{col}(\lambda) = 1.439 + \frac{158804}{\lambda^2} - \frac{1.48 \times 10^9}{\lambda^4} + \frac{4.39 \times 10^{13}}{\lambda^6}. \quad (17)$$

Показатель преломления мышечных волокон может быть взят равным 1.48-1.49 [33, 259].

Проникновение ОПА в биоткань приводит к увеличению показателя преломления внутриканевой жидкости. Временную зависимость показателя преломления внутриканевой жидкости $n_1(\lambda, t)$ можно найти из закона Гладстона-Далля [52], для двухкомпонентных растворов, одним из компонентов в этом случае является внутриканевая жидкость, другим – ОПА [16, 254]:

$$n_1(\lambda, t) = n_{10}(\lambda) \cdot (1 - C(t)) + n_{opa}(\lambda) \cdot C(t), \quad (18)$$

где $n_{opa}(\lambda)$ - показатель преломления ОПА, $n_{10}(\lambda)$ - показатель преломления внутриканевой жидкости, зависящий от длины волны в начальный момент времени $t = 0$ [16, 98, 254]:

$$n_{10}(\lambda) = 1.351 + \frac{2134.2}{\lambda^2} + \frac{5.79 \times 10^8}{\lambda^4} - \frac{8.15 \times 10^{13}}{\lambda^6}. \quad (19)$$

Задача оценки скорости диффузии решается в рамках модели свободной диффузии с учетом изменения фактора упаковки рассеивателей и наличия встречного потока воды, что выражается в виде среднего значения относительного коэффициента диффузии. Площадь нижней и верхней поверхностей образца значительно превышает площадь боковых сторон образца, поэтому можно пренебречь краевыми эффектами и решать одномерную задачу диффузии. Одномерное уравнение диффузии представляет собой второй закон Фика и имеет вид [16, 26, 33, 49, 132, 251]:

$$\frac{\partial C(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C(x, t)}{\partial x^2}, \quad (20)$$

где $C(x, t)$ - концентрация ОПА в образце биоткани, г/мл; D - относительный коэффициент диффузии ОПА, см²/сек; t - время диффузии, сек; x - пространственная координата по толщине образца, см.

Начальное условие отражает отсутствие иммерсионного агента внутри образца биоткани до иммерсии во всех внутренних точках образца:

$$C(x,0) = 0. \quad (21)$$

Количество иммерсионного агента вокруг образца намного больше, чем объем образца, а, следовательно, первое граничное условие означает, что проникновение агента в образец биоткани не влияет на концентрацию ОПА в кювете [16, 254]:

$$C(0,t) = C_0, \quad (22)$$

где C_0 - концентрация раствора глюкозы в кювете, г/мл.

Первое граничное условие выполнялось в экспериментах, так как объем иммерсионного раствора (глюкозы, глицерина и т.д.) в кювете составлял 3000-5000 мм³, а объем образцов биоткани был менее 150 мм³.

В зависимости от того, какая биологическая ткань исследуется, можно различать диффузию ОПА с одной или с двух сторон образца, следовательно, второе граничное условие будет различным для двух случаев. Для кожи имеет место односторонняя диффузия ОПА в ткань, так как эпидермис обладает сильными барьерными свойствами, направленными против проникновения в кожу чужеродных молекул, поэтому ОПА проникает в образец в основном со стороны дермы. Второе граничное условие для этого случая выражаются следующим образом [16, 254]:

$$\frac{\partial C(l,t)}{\partial x} = 0. \quad (23)$$

Если исследуются мышечная ткань, имеет место двухсторонняя диффузия, в этом случае второе граничное условие примет вид [16, 254]:

$$C(l,t) = C_0 \quad (24)$$

Уравнение диффузии (20) в случае односторонней диффузии, т.е. с учетом начального (21) и граничных (22), (23) условий, имеет следующее решение [16, 254]:

$$C(x,t) = C_0 \left(1 - \sum_{i=0}^{\infty} \frac{4}{\pi(2i+1)} \sin\left(\frac{(2i+1)\pi x}{2l}\right) \exp\left(- (2i+1)^2 t \frac{\pi^2 D}{4l^2}\right) \right). \quad (25)$$

Кинетика изменения концентрации ОПА, усредненная по объему образца, для односторонней диффузии может быть представлена уравнением [16, 254]:

$$C(t) = C_0 \left(1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{i=0}^{\infty} \frac{1}{(2i+1)^2} \exp\left(- (2i+1)^2 t \frac{\pi^2 D}{4l^2}\right) \right). \quad (26)$$

В первом приближении уравнение для односторонней диффузии (26) сводится к уравнению [132, 254]:

$$C(t) \approx C_0 (1 - \exp(-t/\tau)), \quad (27)$$

где τ - характеристическое время диффузии, сек:

$$\tau = \frac{4l^2}{\pi^2 D}. \quad (28)$$

Когда имеет место двухсторонняя диффузия, решение уравнения диффузии (20) с учетом начального (21) и граничных условий (22), (24) принимает вид [16, 254]:

$$C(x, t) = C_0 \left(1 - \sum_{i=0}^{\infty} \frac{4}{\pi(2i+1)} \sin\left(\frac{(2i+1)\pi x}{l}\right) \exp\left(- (2i+1)^2 \frac{D\pi^2 t}{l^2}\right) \right). \quad (29)$$

Кинетика изменения средней концентрации ОПА в образце биоткани в случае двухсторонней диффузии имеет вид [16, 132, 254]:

$$C(t) = C_0 \left(1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{i=0}^{\infty} \frac{1}{(2i+1)^2} \exp\left(- (2i+1)^2 t \frac{\pi^2 D}{l^2}\right) \right). \quad (30)$$

Для двухсторонней диффузии первое приближение уравнения (30) принимает вид (27), однако характеристическое время диффузии τ в этом случае выражается следующим образом:

$$\tau = \frac{l^2}{\pi^2 D}. \quad (31)$$

Для получения параметров интактных образцов биотканей были использованы измерения коллимированного пропускания образцов до начала их оптического просветления. Радиус волокон-рассеивателей a рассчитывается при подстановке начального (при $t=0$) значения коэффициента рассеяния μ_{s0} (интактного образца) и определяющих его величин в уравнение (15). Начальное значение коэффициента рассеяния получали из экспериментальных данных с помощью уравнения:

$$\mu_{s0} = -\frac{\ln(T(t=0))}{l_0} - \mu_{a0}. \quad (32)$$

Радиус волокон для различных образцов кожи принимал значения в диапазоне 40-75 нм [256]. Полученные значения радиуса волокон хорошо согласуются с радиусом волокон кожи человека, измеренным с помощью электронной микроскопии и равным 20-75 нм [49].

Нужно отметить, что в уравнении (12) коэффициенты поглощения и рассеяния принимаются пространственно однородными для каждого момента времени. Это допущение справедливо, поскольку в ходе измерений коэффициент затухания автоматически усредняется вдоль коллимированного пучка света, пересекающего образец. Таким образом, измеренная кинетика описывает поведение пространственно усредненного коэффициента затухания с преобладанием в нем коэффициента рассеяния ($\mu_a \ll \mu_s$).

Для минимизации целевой функции (11) использовался нелинейный метод наименьших квадратов Левенберга-Марквардта, подробно описанный в работе *Press и др.* [255]. Повторение

процедуры повторялась до тех пор, пока экспериментальные и расчетные данные не будут согласованы с заданной точностью. Для завершения итерационного процесса использовалось следующее выражение [254]:

$$\frac{1}{N_t} \sum_{i=1}^{N_t} \frac{|T_c(D, t_i) - T_c^*(t_i)|}{T_c^*(t_i)} \leq 0.01. \quad (33)$$

Для оценки коэффициентов проницаемости биотканей P для различных иммерсионных агентов в случае односторонней диффузии может использоваться следующее выражение [176]:

$$P = \frac{D}{l}. \quad (34)$$

Для двухсторонней диффузии коэффициент проницаемости биотканей выражается следующим образом [176]:

$$P = \frac{\pi^2 D}{l}. \quad (35)$$

Все величины в каждом случае рассчитывались путем усреднения значений, полученных по исследуемым образцам, и представлены в виде среднего значения и его стандартного отклонения ($x \pm sd$).

Отклонения от среднего значения некоторых параметров связаны с индивидуальными особенностями структуры каждого исследуемого образца биологической ткани, ошибками измерений и обработки результатов. Несмотря на это, можно видеть общие закономерности поведения полученных спектров, кинетики их изменения и полученных из них параметров.

2.2 Результаты и обсуждение

2.2.1 Исследование кинетики изменения геометрических свойств биотканей при оптическом просветлении гиперосмотическими химическими агентами

На рисунках 3 и 4 представлены зависимости веса (а), толщины (б), площади (в), объема (г) образцов свиного миокарда от времени иммерсии в 40%-растворе глюкозы и 60%-растворе глицерина соответственно, нормированные на начальное значение и усредненные по всем исследуемым образцам. Из рисунков видно, что значение каждой величины начинает снижаться сразу же после помещения образцов в агенты и продолжается в течение приблизительно 5-15 мин иммерсии. Снижение веса образцов миокарда объясняется дегидратацией миокарда вследствие его взаимодействия с иммерсионным агентом. Продольное и поперечное сжатие образцов происходит ввиду изменения упаковки волокон ткани, которые сближаются за счет ее дегидратации. После этапа дегидратации, все величины начинают увеличиваться, и практически

во всех случаях достигают насыщения. Второй этап кинетики изменения параметров характеризуется набуханием биоткани, которое обусловлено диффузией молекул агентов в ткань миокарда.

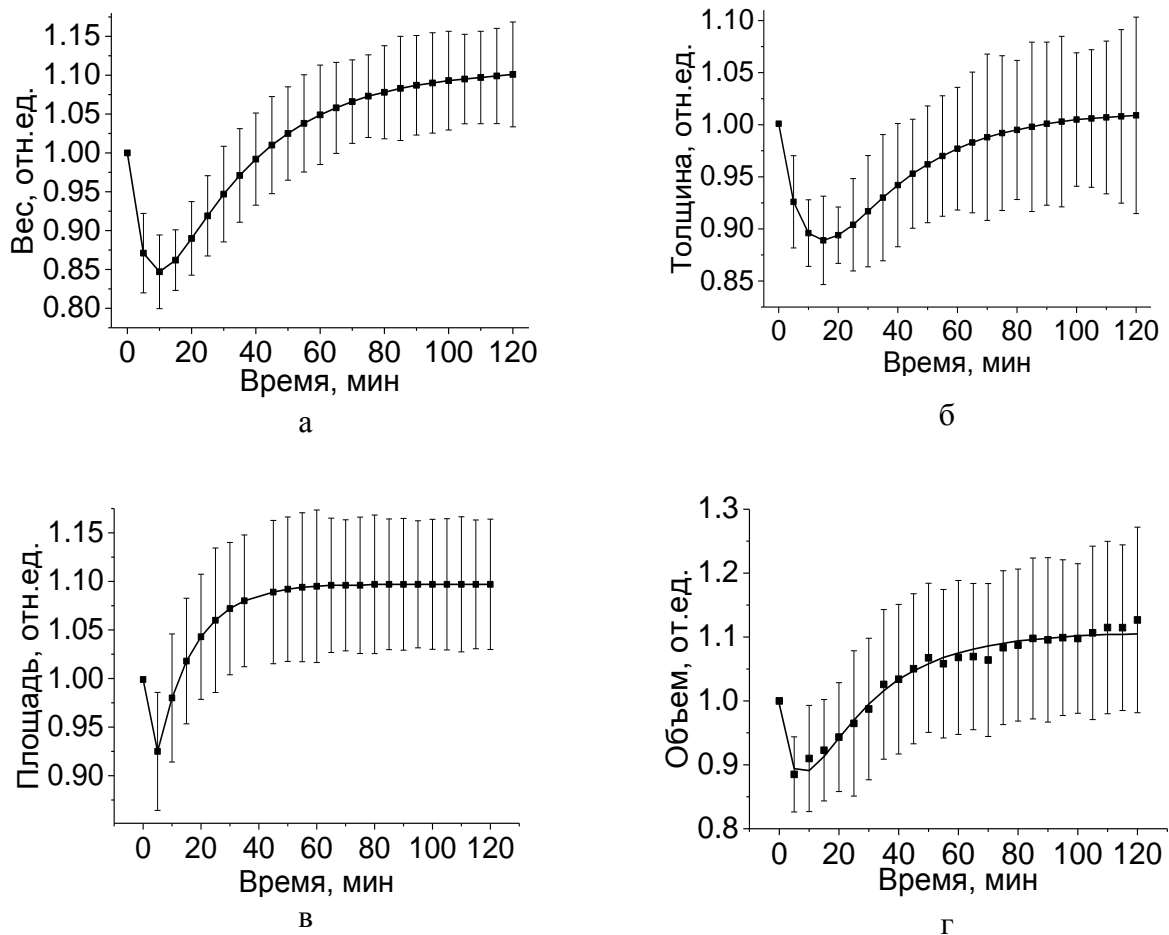


Рисунок 3. Кинетика изменения веса (а), толщины (б), площади (в) и объема (г) образцов миокарда во время их иммерсии в 40%-растворе глюкозы

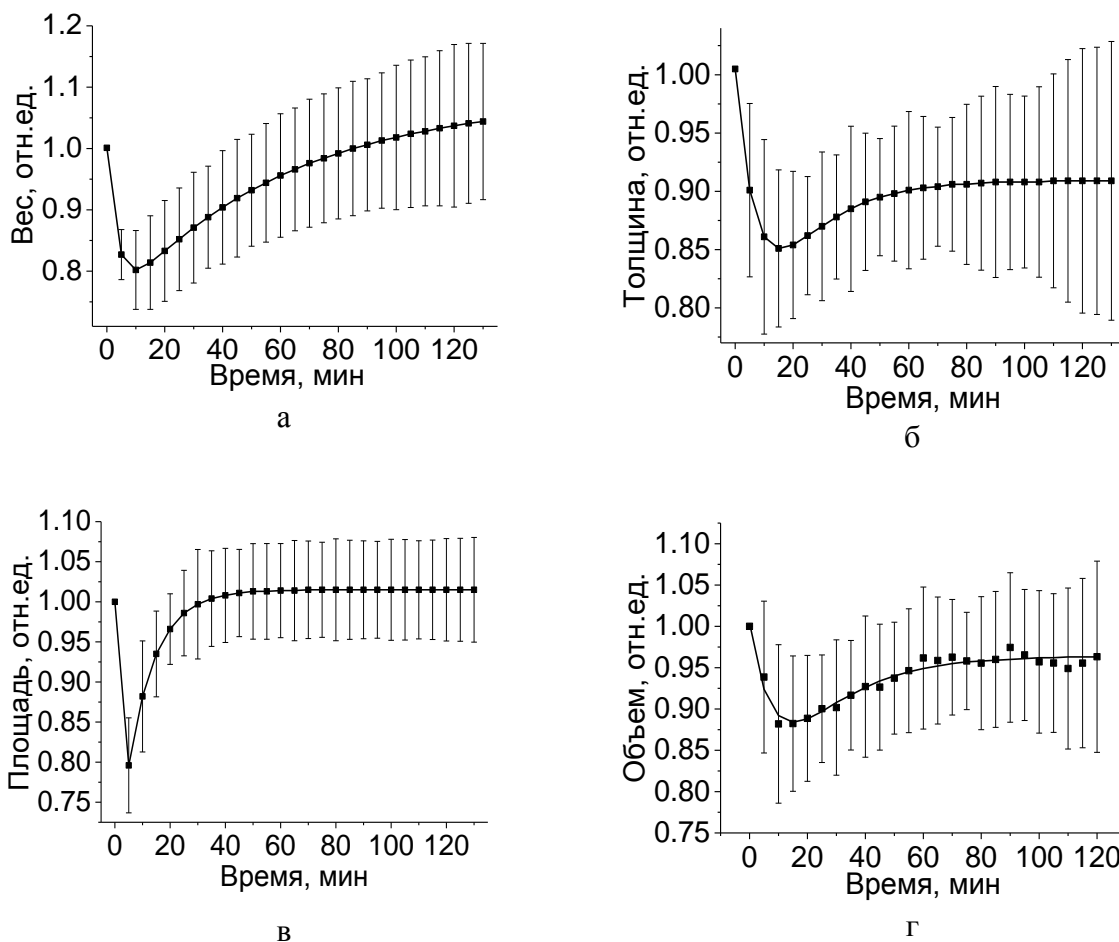


Рисунок 4. Кинетика изменения веса (а), толщины (б), площади (в) и объема образцов миокарда во время их иммерсии в 60%-растворе глицерина

Полученные временные зависимости веса, толщины и площади образцов миокарда, помещенных в иммерсионные агенты, аппроксимировались уравнением 10 для получения количественных характеристик дегидратации/сжатия и набухания образцов. Параметры аппроксимации временных зависимостей веса, толщины, площади и объема образцов миокарда, иммерсированных в 40%-раствор глюкозы и 60%-раствор глицерина, усредненные по всем исследуемым образцам, представлены в таблице 7, где A и B - максимальная степень дегидратации/сжатия и набухания, соответственно, τ_w - характеристическое время диффузии воды, τ_g - характеристическое время диффузии агента, Y_0 - наименьшее значение величины, которое может быть достигнуто.

Таблица 7. Параметры аппроксимации дегидратации/сжатия и набухания образцов миокарда, иммерсированных в 40%-раствор глюкозы и 60%-раствор глицерина

Параметры аппроксимации		Оптический просветляющий агент	
		40%-раствор глюкозы	60%-раствор глицерина
Дегидратация/набухание (Вес)	A^W	0.28±0.04	0.33±0.09
	τ_w^W , мин	4.66±2.32	3.83±2.24
	B^W	0.41±0.07	0.40±0.12
	τ_g^W	42.20±11.02	48.59±14.54
	y_0^W	0.71±0.05	0.67±0.08
Поперечное сжатие/набухание (Толщина)	A^l	0.24±0.10	0.28±0.07
	τ_w^l , мин	9.45±8.14	8.70±7.79
	B^l	0.31±0.14	0.26±0.12
	τ_g^l	63.84±58.79	61.75±59.76
	y_0^l	0.76±0.10	0.73±0.07
Продольное сжатие/набухание (Площадь)	A^S	0.23±0.07	0.34±0.05
	τ_w^S , мин	1.50±0.59	0.18±0.06
	B^S	0.36±0.14	0.34±0.07
	τ_g^S	9.23±5.40	11.01±3.43
	y_0^S	0.76±0.07	0.66±0.05
Объемное сжатие/набухание (Объем)	A^V	0.34±0.13	0.35±0.03
	τ_w^V , мин	5.53±4.69	6.30±4.36
	B^V	0.45±0.16	0.31±0.12
	τ_g^V	24.73±9.87	15.29±12.88
	y_0^V	0.66±0.12	0.65±0.03

Оценивая полученные параметры аппроксимации, можно сказать, что более сильная (A^W , y_0) и быстрая (τ_w) дегидратация миокарда вызвана раствором глицерина. Причем такая тенденция наблюдается для каждой измеряемой величины – веса, толщины, площади. Более

интенсивная дегидратация миокарда при применении раствора глицерина по сравнению с раствором глюкозы объясняется более высокой осмолярностью глицерина.

Приблизительно одинаковая степень набухания миокарда достигается в обоих случаях (B^W), однако, при иммерсии образцов в растворе глюкозы значение степени набухания достигается за меньшее время (τ_g^W). Набухание биоткани связано с диффузией молекул иммерсионного агента в ее межфибрилярное пространство, а так как глюкоза имеет молекулярную массу, которая примерно в два раза больше молекулярной массы глицерина, то диффузия молекул глюкозы в ткань приводит к более сильному увеличению веса образца ткани за меньшее время. Более быстрое набухание миокарда (τ_g^W) в случае иммерсии в 40%-растворе глюкозы может быть связано с тем, что на этапе дегидратации воздействие глицерина привело к более сильному сжатию образца и более сильной потере веса, в связи с этим для возврата ткани из этого состояния требуется больше времени.

Более сильное поперечное набухание миокарда (B^l), помещенного в раствор глюкозы, можно объяснить различной гигроскопичностью глюкозы и глицерина. К каждой молекуле глицерина может присоединиться около шести молекул воды [59], в то время как глюкоза может присоединить порядка 10 молекул воды [260]. Таким образом, если молекула глюкозы находится в биоткани, она способна удержать больше молекул воды, оставшихся в ткани, а, следовательно, это приведет к большему набуханию ткани. Также более сильное и медленное набухание было получено из кинетики изменения всего объема.

Набухание образцов миокарда также является следствием помещения образцов в раствор с рН равным приблизительно 3 и 4 для раствора глюкозы и глицерина, соответственно (табл. 4), при том, что рН ткани миокарда равен примерно 5.5 [191].

Полученные временные зависимости веса, толщины, площади и объема образцов кожи от времени воздействия 40%-раствора глюкозы, нормированные на начальные значения параметров, усредненные по всем исследуемым образцам и аппроксимированные уравнением 10 представлены на рисунке 5. Все параметры начинают снижаться сразу же после помещения образцов в раствор глюкозы. Уменьшение веса образцов кожи (дегидратация) продолжается около 1 часа (рис. 5а). Снижение толщины (поперечного сжатия) (рис. 5б), площади (продольного сжатия) (рис. 5в) и, соответственно, объема образцов (рис. 5г) наблюдалось в течении примерно 20 минут. Далее наблюдается последующее незначительное увеличение веса образцов (но не до первоначальной величины), а также поперечное и продольное набухание образцов кожи. За 2 часа иммерсии толщина образцов возвращается примерно к исходным

значениям, но площадь и, соответственно, объем образцов, медленно увеличиваясь, за время наблюдения не достигает начальных значений.

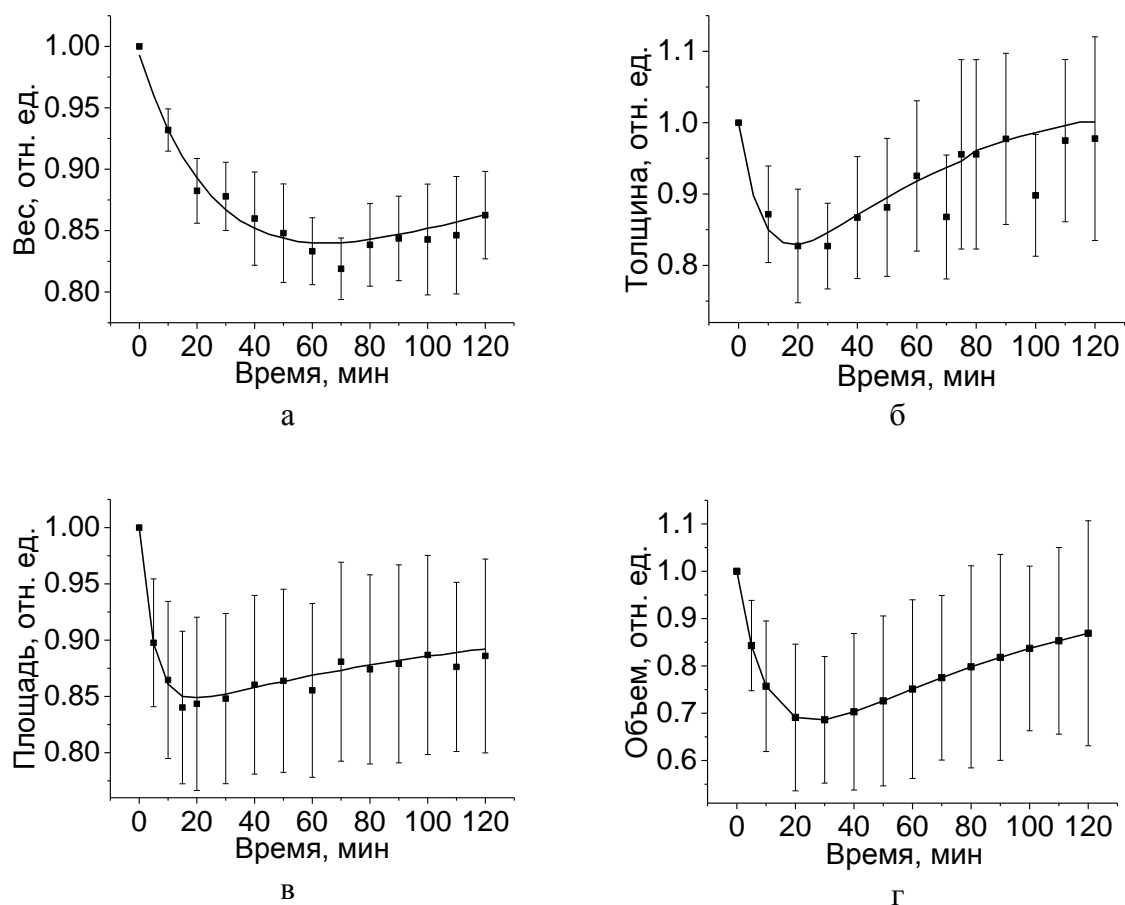


Рисунок 5. Кинетика изменения веса (а), толщины (б) площади (в) и объема (г) образцов кожи *ex vivo* под действием 40%-раствора глюкозы.

Параметры аппроксимации дегидратации/сжатия и набухания образцов кожи крыс под действием 40%-раствора глюкозы представлены в таблице 8. Наибольшее сжатие ($A_D=0.34\pm 0.08$) и набухание ($B_S=0.42\pm 0.19$) наблюдается для толщины. Поперечное сжатие биоткани, сменяющееся набуханием, связано также со значением рН окружающей среды ткани. Изменение рН окружения исследуемой ткани в щелочную или кислотную сторону относительно изоэлектрической точки белков приводит к повышению степени набухания ткани [33]. Изоэлектрическая точка коллагена соответствует значениям рН порядка 7.5-7.8 [254]. Аналогично полученным результатам при иммерсии образца склеры глаза *in vitro* в 40%-растворе глюкозы, который имеет рН=3.5, было получено уменьшение толщины образца, но при более длительном воздействии глюкозы толщина образца увеличивалась до возвращения к ее первоначальному значению [33]. В работе [82] было показано, что степень набухания

(гидратации) склеры быка может увеличиваться почти в 3 раза при изменении рН от 7 (близкого к физиологическому) до 3. Таким образом, при проникновении глюкозы в ткань изменяется значение рН ткани, что приводит к ее набуханию [33]. В рассматриваемом случае коллаген, являющийся основным белковым компонентом кожи (минимальное набухание коллагена наблюдается при значениях рН порядка 7.5-7.8 [254]), помещается в раствор глюкозы с рН = 3 (табл. 4), что и приводит к набуханию образца биоткани.

При иммерсии в 40%-растворе глюкозы наблюдаются две стадии изменения геометрических параметров образцов – дегидратация/сжатие и набухание – как в случае исследования кожи, так и миокарда. При сравнении параметров аппроксимации временных зависимостей веса, толщины и площади образцов (см. Табл. 7 и 8) можно видеть сравнительно близкие значения максимальной степени дегидратации/сжатия тканей (A) и наименьшего значения величины, которое может быть достигнуто (y_0), что может следовать из схожего содержания свободной воды в тканях кожи и миокарда и содержания воды в этих тканях в целом. В то же время большая пролонгированность дегидратации/сжатия (τ_w) и набухания (τ_g) при иммерсии в 40%-растворе глюкозы были получены для образцов кожи, что можно объяснить диффузией воды из ткани и глюкозы в ткань лишь с одной стороны образца ткани (т.е. защитными свойствами рогового слоя), в то время как для миокарда процессы диффузии протекают с обеих сторон образца.

Таблица 8. Параметры аппроксимации дегидратации/сжатия и набухания образцов кожи крыс, иммерсированных в 40%-раствор глюкозы

Параметры аппроксимации	A_D	τ_w , мин	B_S	τ_g , мин	y_0
Дегидратация/набухание (Вес)	0.29±0.07	29±9	0.28±0.22	124±90	0.69±0.07
Поперечное сжатие/набухание (Толщина)	0.34±0.08	12±5	0.42±0.19	81±49	0.66±0.07
Продольное сжатие/набухание (Площадь)	0.20±0.05	10±12	0.13±0.11	120±66	0.80±0.05
Объемное сжатие/набухание (Объем)	0.44	9.8	0.52	130	0.56

Изменение площади образцов на обеих стадиях – сжатия и набухания ($A_D=0.20\pm 0.05$, $B_S=0.13\pm 0.11$) наименее выражено, так как длина волокон ткани меньше подвергается изменению по сравнению с расстоянием между волокнами. Кинетика изменения объема сочетает в себе два процесса - поперечное и продольное изменение геометрии образца, поэтому она имеет самые высокие значения максимальной степени набухания ($B_S=0.52$) и сжатия ($A_D=0.44$). Уменьшение веса образцов (дегидратация) кожи занимает больше времени ($\tau_w=29\pm 9$ мин), чем для продольного и поперечного сжатия. Видимо, несмотря на увеличение объема биоткани за счет отклонения рН от физиологического, продолжается дегидратация ткани ввиду создаваемого раствором осмотического давления.

На рисунке 6 представлена кинетика изменения веса, толщины, площади и объема образцов кожи крысы, помещенных в ПЭГ-300 и ПЭГ-400. Экспериментальные данные нормировались на значения, измеренные в начальный момент времени, усреднялись по всем образцам, после чего аппроксимировались уравнением 9. Из рисунков 6 (а-г) видно, что при иммерсии в обоих ПЭГ происходит уменьшение всех измеренных параметров: через 120 минут дегидратации вес образцов под действием ПЭГ-300 и ПЭГ-400 уменьшился примерно на 32% и 37%, толщина - на 30% и 38%, площадь – на 24% и 30% и объем образцов уменьшился примерно на 47% и 56%, соответственно.

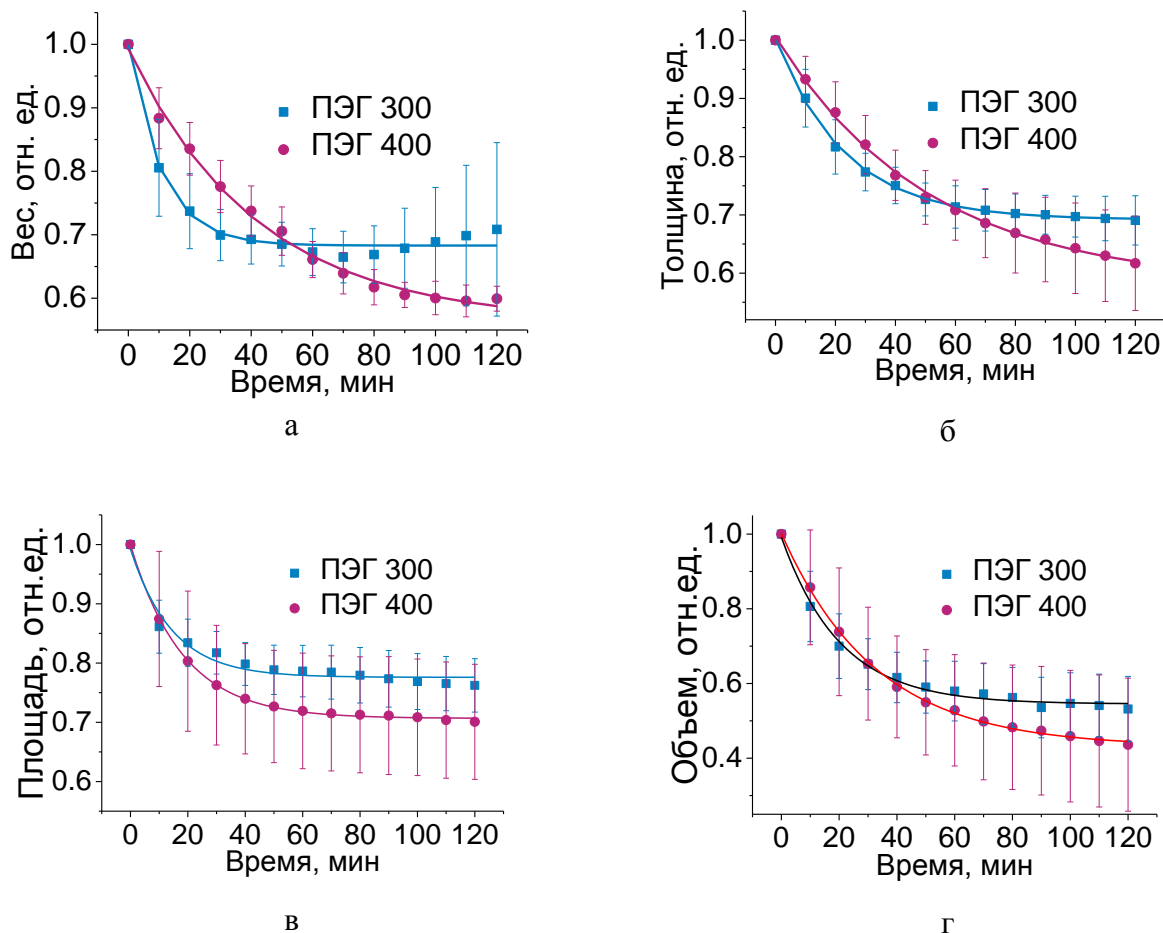


Рисунок 6. Кинетика изменения веса (а), толщины (б), площади (в) и объема (г) образцов кожи во время оптического просветления ПЭГ-300 и ПЭГ-400. Точки соответствуют экспериментальным данным, сплошная линия - аппроксимации согласно уравнению 9.

Результаты анализа кинетики дегидратации с использованием уравнения 9 представлены в таблице 9. Из рисунка 6 и таблицы 9 видно, что ПЭГ-300 и ПЭГ-400, несмотря на схожесть этих веществ, вызывают разную степень дегидратации кожи. За общее время измерений (2 часа) ПЭГ-400 вызывает более сильную дегидратацию кожи ($A^W=0.43\pm 0.012$), в то время как ПЭГ-300 наиболее эффективен в течение первых 30-60 минут воздействия на кожу (рис. 6 а, б, г), что связано с меньшей вязкостью и большим осмотическим давлением ПЭГ-300. Данный результат хорошо коррелирует с данными работы [211], в которой, на примере дегидратации свиной кожи ПЭГ-200 и ПЭГ-400, было показано, что в первые полчаса дегидратации ПЭГ-200 вызывает большую дегидратацию кожи по сравнению с ПЭГ-400. Процесс дегидратации кожи под действием ПЭГ-300 происходит с большей скоростью ($\tau_w^W=12.51\pm 0.44$), чем под действием ПЭГ-400 ($\tau_w^W=52.12\pm 4.07$), и насыщается быстрее (рис. 6 а).

Существенные различия наблюдаются и при сравнении величины (A) и скорости (τ_w) продольного и поперечного сжатия образцов, что связано со структурой кожи, в которой коллагеновые и эластиновые волокна, составляющие ее каркас, расположены параллельно поверхности кожи. Видно, что если продольное сжатие образцов кожи практически прекращается примерно через час воздействия как для ПЭГ-300, так и для ПЭГ-400, то поперечное сжатие продолжается в течение всех двух часов измерений, что особенно заметно для ПЭГ-400 (рис. 6 б, в). Очевидно, что уменьшение длины волокон менее выражено по сравнению с уменьшением внутритканевого пространства между ними вследствие осмотической дегидратации ткани.

Таблица 9. Параметры аппроксимации дегидратации/сжатия кожи под действием ПЭГ-300 и ПЭГ-400

Параметры аппроксимации		Просветляющий агент	
		ПЭГ-300	ПЭГ-400
Дегидратация (Вес)	A^W	0.32±0.01	0.43±0.01
	τ_w^W , мин	12.51±0.44	52.12±4.07
	y_0^W	0.68±0.01	0.57±0.01
Поперечное сжатие (Толщина)	A^l	0.31±0.01	0.47±0.03
	τ_w^l , мин	29.37±3.54	68.45±9.61
	y_0^l	0.69±0.01	0.53±0.03
Продольное сжатие (Площадь)	A^S	0.22±0.01	0.29±0.01
	τ_w^S , мин	14.46±1.76	18.23±0.38
	y_0^S	0.78±0.01	0.71±0.01
Объемное сжатие (Объем)	A^V	0.45±0.011	0.57±0.01
	τ_w^V , мин	20.32±1.17	32.49±0.84
	y_0^V	0.55±0.01	0.43±0.01

Таким образом, можно заключить, что дегидратация кожи под действием ПЭГ-300 происходит быстрее по сравнению с ПЭГ-400, что объясняется меньшей вязкостью и большим осмотическим давлением ПЭГ-300, в то время как степень дегидратации под действием ПЭГ-400 сильнее по сравнению с ПЭГ-300. Меньшая степень дегидратации кожи под действием ПЭГ-300, по-видимому, связана с ослаблением гигроскопичности с увеличением молекулярного

веса ПЭГ, т.е. проникая вглубь кожи, ПЭГ-300, в силу его большей гигроскопичности [231, 238], более эффективно связывает внутритканевую воду и останавливает процесс осмотической дегидратации.

Вариации в поведении геометрических параметров биотканей при использовании разных химических агентов – отсутствие стадии набухания в случае иммерсии образцов кожи в ПЭГ – связано с различными значениями рН растворов и биологических тканей. Значения рН как ПЭГ-300, так и ПЭГ-400 (~7) близки к значению рН (7.5-7.8 [254]) при котором набухание коллагена минимально и, следовательно, ПЭГ не должен вызывать существенного набухания образцов кожи.

2.2.2 Определение коэффициентов диффузии глюкозы и глицерина в сердечной мышечной ткани *in vitro*

Спектры коллимированного пропускания образцов миокарда измерялись при воздействии на них 40%-раствора глюкозы и 60%-раствора глицерина. Типичные спектры коллимированного пропускания образца миокарда, измеренные во время иммерсии в 40%-растворе глюкозы, представлены на рисунке 7а. Видно, что образец слабо пропускает видимый свет в первые минуты измерений, что обусловлено рассеянием света в ткани. Затем наблюдается достаточно быстрый рост коллимированного пропускания и примерно через 40-50 минут после начала измерений стабилизируется и дальнейшего увеличения пропускания не наблюдается. Полученные данные были использованы для анализа кинетики изменения коллимированного пропускания образца миокарда, погруженного в 40%-раствор глюкозы (рис. 7б).

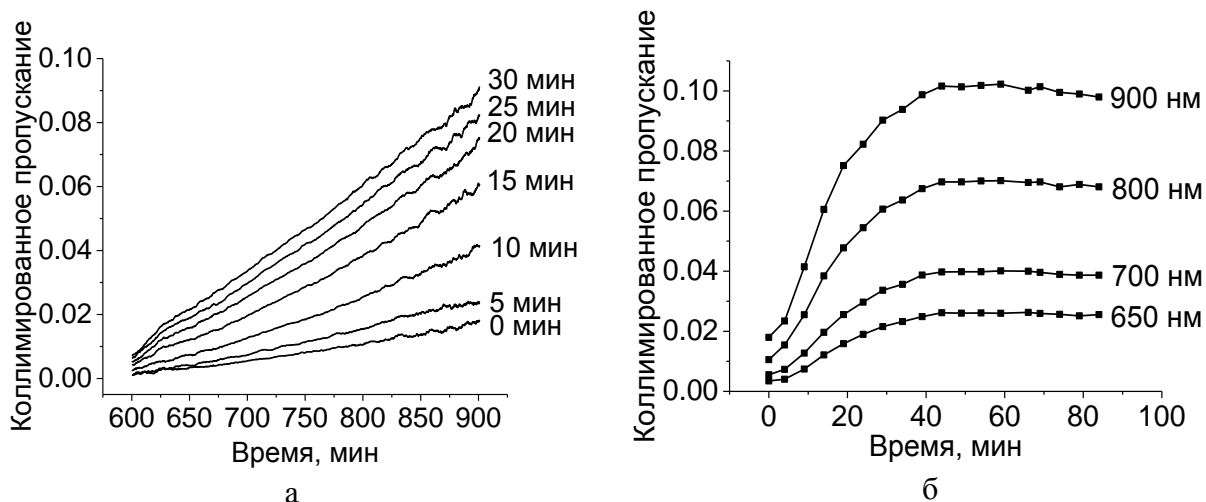


Рисунок 7. а) Спектры коллимированного пропускания образца свиного миокарда, помещенного в водный 40%-раствор глюкозы, измеренные в разное время, б) Кинетика изменения коллимированного пропускания образца миокарда на разных длинах волн, помещенного в водный 40%-раствор глюкозы

Увеличение коллимированного пропускания образца происходит вследствие его дегидратации и диффузии молекул глюкозы в межфибрилярное пространство, что хорошо согласуется с результатами, полученными при исследовании кинетики изменения геометрических свойств миокарда при оптическом просветлении 40%-раствором глюкозы (п.п. 2.2.1). Вызванное таким образом согласование показателей преломления компонентов биоткани приводит к снижению рассеяния света в миокарде. Приблизительно через 40 минут после помещения образца в 40%-раствор глюкозы оптическое просветление замедляется и завершается во всем исследуемом диапазоне длин волн.

С увеличением длины волны коэффициент коллимированного пропускания принимает большие значения, что обусловлено более сильным рассеянием света в коротковолновой области спектра [32]. Слабое пропускание света через образец вблизи 600 нм обусловлено сильным поглощением света данной области спектра миоглобином [111].

Типичные спектры коллимированного пропускания образца миокарда, полученные при воздействии на него 60%-раствором глицерина, представлены на рисунке 8а. Кинетика изменения коллимированного пропускания образца миокарда, помещенного в 60%-раствор глицерина, полученная из измеренных спектров, представлена на рисунке 8б. Значения коэффициентов коллимированного пропускания начинают стремительно расти в первые же минуты после помещения образца в раствор глицерина во всем исследуемом диапазоне длин волн. В первые десять минут действия раствора глицерина на ткань миокарда наблюдается быстрое увеличение коллимированного пропускания на всех измеряемых длинах волн, затем

рост замедляется и завершается приблизительно через 15 минут после помещения образца в раствор. Механизм оптического просветления ткани миокарда раствором глицерина аналогичен тому, который имеет место при использовании раствора глюкозы, что также согласуется с результатами, полученными при исследовании изменения геометрических свойств образцов миокарда при их иммерсии в растворе глицерина (п.п. 2.2.1).

Поведение кинетики коллимированного пропускания образцов миокарда под действием 40%-раствора глюкозы и 60%-раствора глицерина схоже. В обоих случаях коэффициент пропускания света биотканью увеличивается – этап оптического просветления, после чего процесс оптического просветления завершается – этап насыщения. Однако, судя по представленным графикам, рост коллимированного пропускания миокарда быстрее и сильнее в случае использования раствора глицерина, оптическое просветление с помощью 40%-раствора глюкозы требует больше времени.

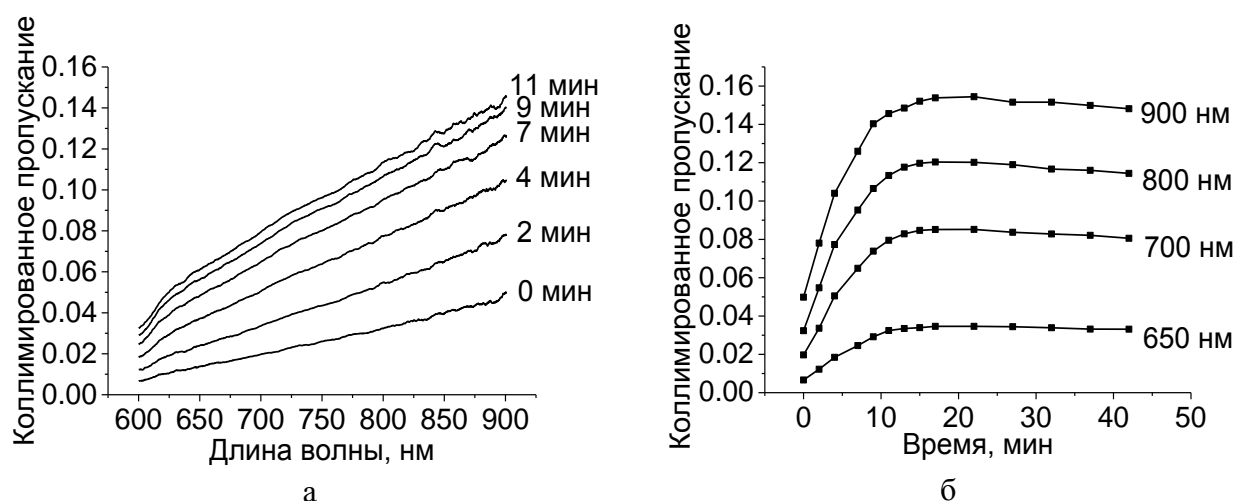


Рисунок 8. а) Спектры коллимированного пропускания образца миокарда, помещенного в водный 60%-раствор глицерина, измеренные в разное время, б) Кинетика изменения коллимированный пропускания образца миокарда, помещенного в водный 60%-раствор глицерина

Для оценки характеристического времени диффузии агентов в миокард (τ) и максимального пропускания света через образцы миокарда ($T_{\max} - T_0$) кинетика изменения коллимированного пропускания, полученная для каждого образца миокарда, аппроксимировалась с помощью уравнения 5 на разных длинах волн. Характеристическое время диффузии глюкозы в миокарде в среднем составило $\tau = 20 \pm 12$ мин (табл. 10), глицерина - $\tau = 12 \pm 10$ мин. Максимальное пропускание коллимированного света через образцы миокарда ($T_{\max} - T_0$), иммерсированные в раствор глюкозы, в среднем составило 4.8%, в случае иммерсии

в растворе глицерина - 10.7%, (табл. 10). Таким образом, было получено, что при использовании 60%-раствора глицерина требуется меньше времени для завершения оптического просветления образца миокарда по сравнению с 40%-раствором глюкозы, а также воздействие 60%-раствора глицерина на миокард дает более высокую степень оптического просветления, что объясняется более высоким значением показателя преломления раствора глицерина и соответственно лучшим согласованием показателей преломления насыщенной глицерином внутритканевой жидкости и структурных компонент миокарда.

Полученные временные зависимости коллимированного пропускания образцов миокарда при их иммерсии в 40%-растворе глюкозы и 60%-растворе глицерина использовались для вычисления коэффициентов диффузии глюкозы и глицерина в ткани миокарда *in vitro*, которое было выполнено с использованием алгоритма, описанного в пункте 2.1.4. Средние значения коэффициентов диффузии (D) глюкозы и глицерина в ткани миокарда были получены равными $(4.75 \pm 3.40) \times 10^{-7}$ см²/сек и $(7.71 \pm 4.63) \times 10^{-7}$ см²/сек, соответственно (табл. 10). Коэффициент проницаемости (P) миокарда для глюкозы получен с использованием формулы (35) равным $(7.45 \pm 6.02) \times 10^{-5}$ см/сек, для глицерина - $(1.48 \pm 0.91) \times 10^{-4}$ см/сек (табл. 10). Из полученных результатов следует, что скорость диффузии глицерина в миокарде больше по сравнению со скоростью диффузии глюкозы. Различия в скорости проникновения веществ могут быть связаны с разной вязкостью растворов. Раствор глюкозы более вязкий (табл. 4), а, следовательно, имеет меньшую скорость диффузии. Также медленная диффузия глюкозы в миокарде может быть обусловлена взаимодействием молекул глюкозы с водой, оставшейся в биоткани, которое слабее выражено у глицерина [59, 260].

Полученный коэффициент диффузии глюкозы в миокарде $(4.75 \pm 3.40) \times 10^{-7}$ см²/сек (табл. 10) близок к коэффициенту диффузии глюкозы в скелетной мышце 8.3×10^{-7} см²/сек, [60]. Отличие скорости диффузии глюкозы в этих тканях могут быть связаны с различной организацией мышечных волокон.

Коэффициенты диффузии воды в миокарде крысы были получены с помощью метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР) в работе [261] равными $(2.5 \pm 0.5) \times 10^{-5}$ см²/сек и $(1.8 \pm 0.4) \times 10^{-5}$ см²/сек при ориентации градиента поля импульса перпендикулярно и параллельно эпикардиальной поверхности ткани, соответственно, при температуре 37°C. Более быстрая диффузия воды в миокарде по сравнению с глюкозой или глицерином согласуется с результатами, представленными в п. 2.2.1, где была получена более быстрая дегидратация миокарда (т.е. выход воды из ткани) по сравнению с набуханием ткани, которое связано с диффузией молекул агента в ткань.

Как следует из п.п. 2.2.1, дегидратация образца миокарда вследствие его контакта с гиперосмотическим агентом приводит к изменению его толщины и веса. Для контроля

изменения толщины и веса образцов, которое могло произойти при записи спектров коллимированного пропускания, толщина и вес образцов измерялись до и после записи спектров. Среднее значение толщины образцов перед их помещением в раствор глюкозы составило 0.66 ± 0.12 мм, после проведения измерений (приблизительно через 1.5 часа) 0.58 ± 0.19 мм.

Среднее значение толщины образцов миокарда перед их помещением в раствор глицерина было равно 0.52 ± 0.06 мм, после снятия спектров (через 40-60 минут после помещения в раствор глицерина) – 0.47 ± 0.03 мм. Вес образцов после воздействия на них глицерина уменьшился в среднем на 14%. Эти данные согласуются с поперечным сжатием и снижением веса образцов миокарда, полученными в п.п. 2.2.1. Различие в потере веса образцов при применении растворов глюкозы ($\Delta W \approx 8\%$) и глицерина ($\Delta W \approx 14\%$) связано с осмотическими свойствами растворов. Так как осмолярность 60%-раствора глицерина (12.48 осмоль/л) выше осмолярности 40%-раствора глюкозы (2.22 осмоль/л) [179] (таблица 4), глицерин создает более сильное осмотическое давление по сравнению с глюкозой, что приводит к более сильной дегидратации биологической ткани. Таким образом, более быстрое оптическое просветление миокарда 60%-раствором глицерина по сравнению с 40%-раствором глюкозы связано с более быстрой и сильной дегидратацией биоткани в этом случае, а также с более быстрой диффузией глицерина в ткань.

Таблица 10. Значения толщины образцов миокарда до и после их помещения в 40%-раствор глюкозы и 60%-раствор глицерина, коэффициентов диффузии глюкозы и глицерина в ткани миокарда, коэффициентов проницаемости миокарда для глюкозы и глицерина, максимального пропускания света через образцы, характеристического времени диффузии агентов в образцы миокарда

ОПА	l , см (до/после)	D , см ² /сек	P , см/сек	$T_{\max} - T_0$, отн. ед.	τ , мин
40%-раствор глюкозы	$0.066 \pm 0.012 /$ 0.058 ± 0.019	$(4.75 \pm 3.40) \times 10^{-7}$	$(7.45 \pm 6.02) \times 10^{-5}$	0.048 ± 0.034	20 ± 12
60%-раствор глицерина	$0.052 \pm 0.006 /$ 0.047 ± 0.003	$(7.71 \pm 4.63) \times 10^{-7}$	$(1.48 \pm 0.91) \times 10^{-4}$	0.107 ± 0.052	12 ± 10

Нужно отметить, что набухание миокарда (увеличение веса, толщины и площади образцов – рис. 3, 4) во время оптического просветления, сменяющее его дегидратацию, не приводит к снижению коллимированного пропускания образцов, возможно лишь сравнительно

небольшое уменьшение пропускания света, видимое на графиках кинетики изменения коллимированного пропускания образцов миокарда (рис. 3, 6). Подобное поведение биоткани аналогично эффектам, наблюдавшимся при оптическом просветлении склеры глаза *in vitro* 40%-раствором глюкозы, когда было выявлено её значительное оптическое просветление, сопровождающееся уменьшением толщины образца. При более длительном воздействии раствора глюкозы на склеру процесс оптического просветления насыщается, а толщина склеры увеличивается. Несмотря на сложное поведение толщины образца ткани под действием 40%-раствора глюкозы, вариации толщины образца не сильно влияют на его оптическое просветление [33].

Эффективность (степень) оптического просветления образцов миокарда OC_{eff} на разных длинах волн оценивалась с помощью уравнения 7. Рассчитанные значения эффективности ОП образцов миокарда, помещенных в 40%-раствор глюкозы и 60%-раствор глицерина, представлены в таблице 11. Эффективность ОП в исследуемом диапазоне длин волн выше в случае использования раствора глицерина. Более высокая эффективность ОП миокарда раствором глицерина связана с более сильной степенью дегидратации ткани и более высоким показателем преломления раствора, более близким к показателю преломления волокон ткани, что обеспечивает меньшее рассеяние света в миокарде.

Таблица 11. Эффективность оптического просветления образцов миокарда, помещенных в 40%-раствор глюкозы и 60%-раствор глицерина, на разных длинах волн.

Длина волны	600 нм	700 нм	800 нм	900 нм
40%-раствор глюкозы	0.37±0.13	0.39±0.13	0.43±0.13	0.44±0.15
60%-раствор глицерина	0.47±0.08	0.46±0.08	0.47±0.08	0.47±0.08

2.2.3 Определение коэффициентов диффузии гиперосмотических химических агентов в коже *ex vivo*

На рисунках 9 и 10 представлены типичные спектры и кинетика изменения коллимированного пропускания образцов кожи под действием ПЭГ-300 и ПЭГ-400 в диапазоне длин волн 500-900 нм, измеренная в течение 2 часов иммерсии образцов в агентах. Из рисунка 9 видно, что в начальный момент времени кожа представляет собой среду, практически непрозрачную в видимой и ближней ИК области спектра. По мере проникновения ПЭГ во внутритканевую жидкость и одновременной дегидратации кожи наблюдается уменьшение

рассеяния и, соответственно, увеличение коллимированного пропускания образцов. Видно, что оптическое просветление образцов кожи происходит во всем исследуемом диапазоне длин волн.

На рисунке 10 хорошо видно, что рост коллимированного пропускания наблюдается в основном в течение первых 60-70 минут измерений. Затем процесс стабилизируется, и, начиная примерно с 80-90 минуты просветления кожи, существенного увеличения величины коллимированного пропускания не наблюдается.

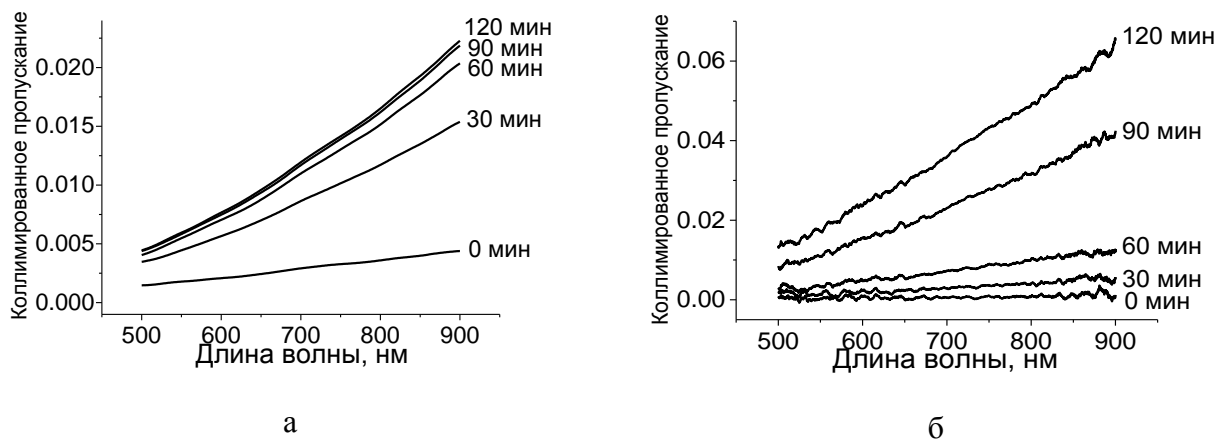


Рисунок 9. Типичные спектры коллимированного пропускания кожи крысы *ex vivo*, измеренные в различные моменты времени после их помещения в ПЭГ-300 (а) и в ПЭГ-400 (б)

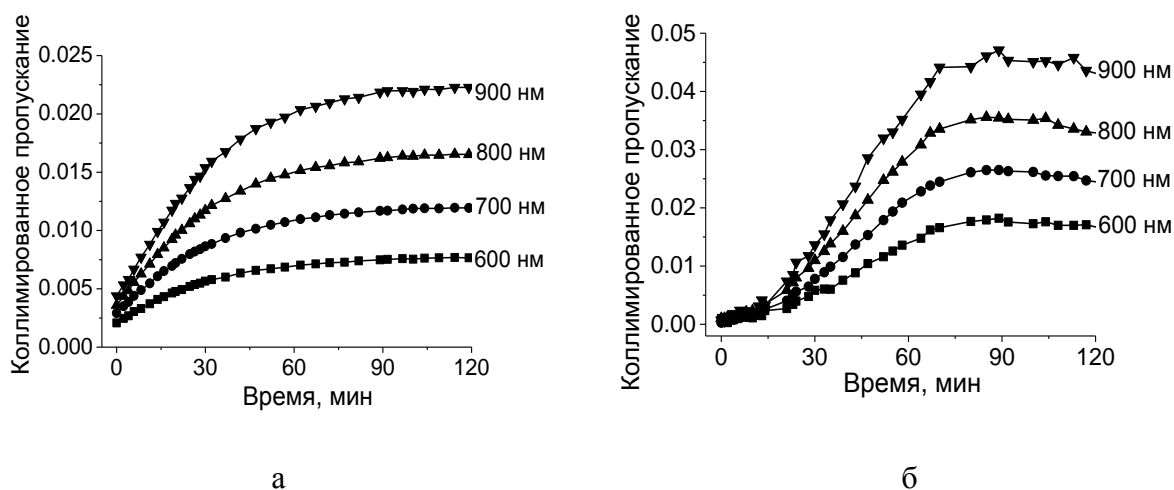


Рисунок 10. Типичная кинетика изменения коэффициента коллимированного пропускания кожи крысы *ex vivo* под действием ПЭГ-300 (а) и ПЭГ-400 (б), измеренная на нескольких длинах волн

Для сравнения влияния ПЭГ-300 и ПЭГ-400 на оптические и диффузионные свойства кожи была проведена оценка степени эффективности ОП кожи под действием данных агентов, коэффициентов диффузии и проницаемости кожи для агентов. Эффективность оптического просветления кожи оценивалась в трех спектральных диапазонах с помощью выражения 7. Полученные результаты представлены в таблице 12. Из представленной таблицы видно, что эффективность оптического просветления растет с увеличением длины волны, увеличиваясь, например, с 0.16 ± 0.12 (на 600 нм) до 0.21 ± 0.15 (на 800 нм) через 10 минут после начала воздействия для ПЭГ-300 или с 0.31 ± 0.14 (на 600 нм) до 0.36 ± 0.11 (на 800 нм) через 60 минут после начала воздействия для ПЭГ-400. Данное поведение объясняется тем, что с ростом длины волны уменьшается различие между значениями показателя преломления рассеивателей кожи (уравнение 17) и значениями показателя преломления внутритканевой жидкости (уравнение 19).

Таблица 12. Степень оптического просветления кожи под действием ПЭГ-300 и ПЭГ-400

Время измерения, мин	Длина волны					
	600 нм		700 нм		800 нм	
	ПЭГ-300	ПЭГ-400	ПЭГ-300	ПЭГ-400	ПЭГ-300	ПЭГ-400
5	0.11 ± 0.09	0.07 ± 0.07	0.11 ± 0.10	0.06 ± 0.06	0.14 ± 0.12	0.07 ± 0.04
10	0.16 ± 0.12	0.10 ± 0.08	0.18 ± 0.13	0.12 ± 0.11	0.21 ± 0.15	0.12 ± 0.09
15	0.19 ± 0.13	0.16 ± 0.12	0.24 ± 0.15	0.19 ± 0.16	0.27 ± 0.17	0.17 ± 0.13
30	0.24 ± 0.15	0.24 ± 0.16	0.28 ± 0.15	0.28 ± 0.18	0.32 ± 0.18	0.28 ± 0.16
60	0.27 ± 0.15	0.31 ± 0.14	0.32 ± 0.16	0.35 ± 0.12	0.35 ± 0.17	0.36 ± 0.11
120	0.28 ± 0.13	0.37 ± 0.15	0.32 ± 0.13	0.40 ± 0.11	0.36 ± 0.14	0.42 ± 0.10

Кинетика изменения эффективности оптического просветления кожи под действием ПЭГ-300 и ПЭГ-400, полученная путем усреднения значений эффективности ОП кожи на исследуемых длинах волн, представлена на рисунке 11. Сравнение между собой значений эффективности ОП (OC_{eff}), вызванного ПЭГ-300 и ПЭГ-400, показывает, что в течении первых 30 минут иммерсии эффективность ОП больше для ПЭГ-300 по сравнению с ПЭГ-400. Это объясняется тем, что в начальный период времени фактор упаковки рассеивателей (уравнение 15), принимает меньшие значения для ПЭГ-300 по сравнению со значениями для ПЭГ-400. Поскольку в начальный период времени концентрация ПЭГ в коже относительно невелика, т.е. сечение рассеяния меняется незначительно, то оптическое просветление в основном определяется дегидратационным механизмом. Полученные результаты хорошо коррелируют с данными работы [236] в которой было показано увеличение эффекта просветления с ростом

молекулярного веса ПЭГ. Поведение эффективности ОП со временем иммерсии образцов в ПЭГ также коррелирует с кинетикой изменения геометрических параметров образцов (п. 2.2.1.), где ПЭГ-400 в течение 30-60 минут иммерсии вызывает более слабую, а затем более сильную дегидратацию и сжатие образцов кожи.

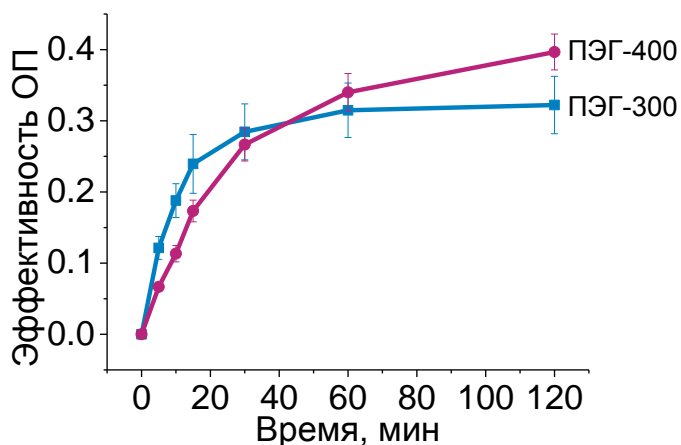


Рисунок 11. Кинетика изменения эффективности оптического просветления кожи под действием ПЭГ-300 и ПЭГ-400

Оценка коэффициента диффузии ПЭГ в коже была выполнена на основе анализа кинетики изменения коллимированного пропускания кожи крысы *ex vivo* с использованием алгоритма, представленного в п.п. 2.1.4 с учетом кинетики изменения структурных и геометрических параметров кожи. Измеренные значения коэффициента диффузии составили $(1.83 \pm 2.22) \times 10^{-6}$ см²/сек для ПЭГ-300 и $(1.70 \pm 1.47) \times 10^{-6}$ см²/сек для ПЭГ-400 (табл. 13). Полученное значение коэффициента диффузии ПЭГ-300 в коже больше по сравнению с коэффициентом диффузии ПЭГ-400, причем соотношение коэффициентов диффузии ПЭГ-300/ПЭГ-400 хорошо согласуется с данными по их диффузии в воде [262]: 5.08×10^{-6} см²/сек (для ПЭГ-300) и 4.45×10^{-6} см²/сек (для ПЭГ-400) и значениями коэффициентов диффузии ПЭГ-300 и ПЭГ-400 в роговом слое эпидермиса кожи [239]: $(4.5 \pm 2.9) \times 10^{-9}$ см²/час (для ПЭГ-300) и $(3.7 \pm 2.5) \times 10^{-9}$ см²/час (для ПЭГ-400), что составляет $\sim 1.25 \times 10^{-12}$ см²/сек (для ПЭГ-300) и $\sim 1.03 \times 10^{-12}$ см²/сек (для ПЭГ-400).

Таблица 13. Значения толщины образцов кожи до их помещения в ПЭГ, коэффициентов диффузии ПЭГ-300 и ПЭГ-400 в ткани кожи, коэффициентов проницаемости кожи для ПЭГ-300 и ПЭГ-400

ОПА	l , см	D , см ² /сек	P , см/сек
ПЭГ-300	0.061±0.017	$(1.83±2.22) \times 10^{-6}$	$(2.39±1.94) \times 10^{-5}$
ПЭГ-400	0.066±0.019	$(1.70±1.47) \times 10^{-6}$	$(2.73±2.79) \times 10^{-5}$

Типичные спектры и кинетика изменения коллимированного пропускания образца кожи крысы *ex vivo*, помещенного в 40%-раствор глюкозы, на нескольких длинах волн представлена на рисунке 12. Наблюдается повышение коллимированного пропускания образца кожи, затем насыщение приблизительно через 1 час после помещения образца в агент.

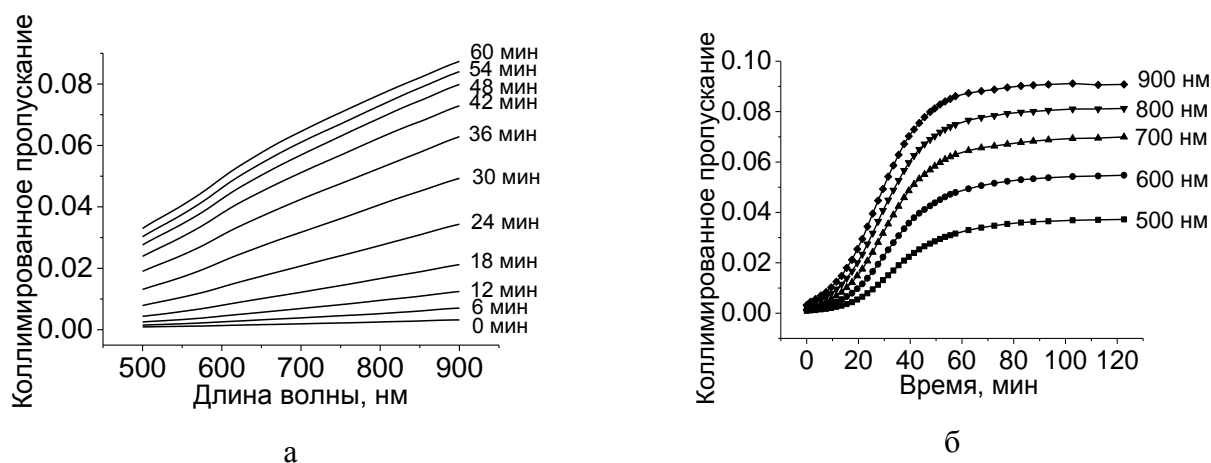


Рисунок 12. Типичные спектры (а) и кинетика изменения (б) коллимированного пропускания образца кожи *ex vivo* помещенного в 40%-раствор глюкозы

Полученные временные зависимости изменения коллимированного пропускания под действием 40%-раствора глюкозы использовались для оценки коэффициента диффузии глюкозы в коже. В таблице 14 приведены средние значения толщины образцов до (l_{before}) и после (l_{after}) погружения в раствор глюкозы, коэффициента диффузии глюкозы в коже (D); коэффициента проницаемости кожи для глюкозы (P) (формула 34); характеристического времени диффузии (τ), полученные из кинетических кривых коллимированного пропускания с помощью уравнения 5. Также в таблице 14 представлены значения эффективности оптического просветления кожи *ex vivo* 40%-раствором глюкозы на нескольких длинах волн, полученные с использованием формулы 7. Наблюдается поперечное набухание образцов кожи после действия 40%-раствора глюкозы: толщина образцов кожи увеличивается от 0.056 ± 0.020 до 0.077 ± 0.047 см.

Коэффициент диффузии глюкозы в коже получен равным $(1.06 \pm 0.88) \times 10^{-6}$ см²/сек, коэффициент проницаемости - $(1.67 \pm 0.91) \times 10^{-5}$ см/сек.

При использовании 40%-раствора глюкозы коэффициент проницаемости кожи человека *in vivo* был получен равным $(1.78 \pm 0.04) \times 10^{-6}$ см/сек [172]. Более высокая проницаемость кожи, полученная в настоящей работе $(1.67 \pm 0.91) \times 10^{-5}$ см/сек может быть связана с тем, что экспериментальные исследования проводились в условиях *in vitro*. В условиях *in vivo* агент наносился на поверхность кожи, где эпидермис является барьером, препятствующим проникновению глюкозы в кожу, т.е. диффузия происходит медленнее, чем в случае, когда диффузия идет со стороны дермы.

Таблица 14. Коэффициент диффузии глюкозы в коже крысы *ex vivo*; коэффициент проницаемости кожи для глюкозы, характеристическое время диффузии глюкозы в коже, эффективность оптического просветления, толщина образцов до и после их помещения в 40%-раствор глюкозы

D (см ² /сек)	P (см/сек)	τ (мин)	l_{before} (см)	l_{after} (см)	OC_{eff}
$(1.06 \pm 0.88) \times 10^{-6}$	$(1.67 \pm 0.91) \times 10^{-5}$	29±18	0.056±0.020	0.077±0.047	0.27±0.01

Проницаемость пищевода для глюкозы была оценена в работе [170] $(1.74 \pm 0.04) \times 10^{-5}$ см/сек, что близко к полученному коэффициенту проницаемости кожи для глюкозы $(1.67 \pm 0.91) \times 10^{-5}$ см/сек. Разная проницаемость кожи и пищевода для глюкозы связаны с различиями в их составе и структуре.

Типичные спектры и кинетика изменения коллимированного пропускания образца кожи крысы *ex vivo*, помещенного в «Омнипак», представлены на рисунке 13. Из приведенных данных видно, что в основном эффект оптического просветления локализован в области 1900-2100 нм, что свидетельствует о дегидратации образца кожи под действием «Омнипака».

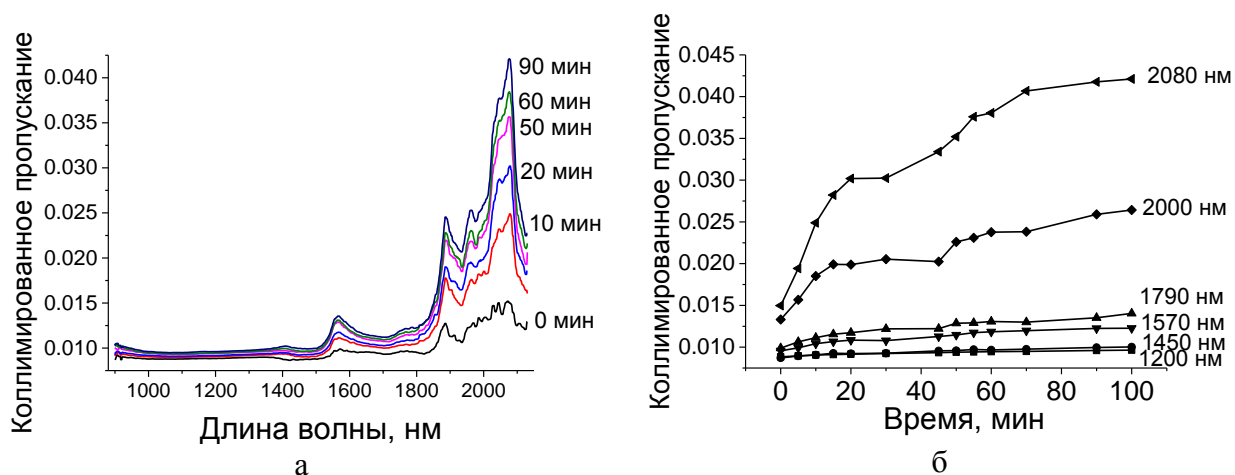


Рисунок 13. Спектры (а) и кинетика изменения (б) коллимированного пропускания образца кожи *ex vivo* помещенного в «Омнипак»

Измеренные спектры коллимированного пропускания кожи использовались для оценки коэффициента диффузии йогексола в коже. В таблице 15 приведены средние значения толщины образцов до их погружения в агент (l_{before}), коэффициента диффузии йогексола в коже (D); времени диффузии (τ), полученные из измеренных спектров. Также в таблице 15 представлены значения эффективности оптического просветления кожи *ex vivo* на нескольких диапазонах длин волн. Коэффициент диффузии йогексола («Омнипак») в коже получен равным $(4.36 \pm 3.84) \times 10^{-7}$ см²/сек.

Таблица 15. Эффективность ОП в нескольких диапазонах длин волн, время и коэффициент диффузии йогексола в коже крысы *ex vivo*

l_{before} (см)	OC_{eff}					τ , мин	D (см ² /сек)	P , см/сек
	100- 1100 нм	1100- 1300 нм	1300- 1600 нм	1600- 1800 нм	1800- 2000 нм			
0.083 ± 0.023	0.04 ± 0.03	0.04 ± 0.03	0.05 ± 0.04	0.06 ± 0.05	0.08 ± 0.09	169 ± 107	$(4.36 \pm 3.84) \times 10^{-7}$	$(5.25 \pm 4.62) \times 10^{-6}$

2.3 Основные результаты исследований

Было показано, что оптическими свойствами сердечной мышцы и кожи можно управлять путем использования различных оптических просветляющих агентов. Впервые были определены коэффициенты диффузии глюкозы и глицерина в миокарде.

В ходе исследований были получены зависимости веса, толщины, площади, объема, коллимированного пропускания образцов миокарда свиньи во время их иммерсии в водном 60%-растворе глицерина и 40%-растворе глюкозы, образцов кожи крысы во время их иммерсии в 40%-растворе глюкозы, ПЭГ-300 и ПЭГ-400. Были измерены спектры коллимированного пропускания кожи во время иммерсии в «Омнипаке».

Из кинетики изменения измеренных величин были оценены степень дегидратации, сжатия и набухания миокарда и кожи, время диффузии агентов в исследуемых биотканях, эффективность оптического просветления образцов биотканей, коэффициенты диффузии ОПА в биотканях, коэффициенты проницаемости исследуемых биологических тканей для ОПА. Были получены степень эффективности ОП и коэффициент диффузии йогексола («Омнипак») в коже.

Было показано, что 40%-раствор глюкозы и 60%-раствор глицерина вызывают набухание биотканей в отличие от ПЭГ-300 и ПЭГ-400.

Глава 3. Исследование диффузии глюкозы в нативной и диабетической коже *ex vivo* при использовании растворов глюкозы разной концентрации

Целью исследования является сравнительный анализ диффузии глюкозы в коже *ex vivo* здоровых мышей и мышей с привитым аллоксановым диабетом; выявление влияния на процесс диффузии структурных изменений кожи вызванных развитием сахарного диабета *in vivo*. Для определения коэффициентов диффузии глюкозы в диабетической и недиабетической коже *ex vivo* использовался метод, основанный на измерении кинетики оптического коллимированного пропускания образцов биоткани под действием раствора глюкозы.

3.1 Материалы и методы

3.1.1. Исследуемые образцы и оптические просветляющие агенты

В исследованиях использовались белые мыши линии Balb/c возрастом 2 месяца с массой тела 20 - 25 г. Исследования проводились на образцах кожи мышей, полученных *ex vivo* после аутопсии. Чтобы избежать зависимости результатов от пола животных, исследования проводились только на самцах, все образцы были взяты со спины животных.

Шерсть с каждого образца перед измерениями удалялась с помощью крема-депилятора «Veet» (Reckitt Benckiser, Франция), подкожный жировой слой удалялся пинцетом. Площадь образцов составляла около 8×15 мм², толщина каждого образца измерялась до и после иммерсии в растворе в 5 точках с помощью микрометра с точностью ± 5 мкм, полученные значения усреднялись.

В качестве оптических просветляющих агентов использовались водные 30%-, 43%- и 56%- растворы глюкозы (весовая концентрация). Водные растворы глюкозы были получены с использованием порошка глюкозы моногидрата (SCR Co., Ltd., Китай) и дистиллированной воды. Показатели преломления и pH растворов (таблица 16) измерялись при комнатной температуре 20°C с помощью рефрактометра Аббе WAY-2S (Optics Ivymen Systems, Испания). Выбранные концентрации растворов глюкозы связаны с содержанием воды в коже и были использованы для того, чтобы вызвать разные потоки воды при применении растворов к коже. Предполагалось, что применение растворов глюкозы с различным содержанием воды может оказывать различное воздействие на кожу в зависимости от общего количества воды и соотношения между свободной, слабо-связанной и связанной водой в коже [61, 62, 67-69, 71, 72].

Таблица 16. Показатели преломления растворов глюкозы

Концентрация глюкозы в растворе	30%	43%	56%
Показатель преломления (589 нм)	1.379	1.398	1.418
pH	5.2	5.7	6.0

Точность рефрактометра Аббе ± 0.0002

3.1.2 Экспериментальная модель сахарного диабета

В качестве экспериментальной модели сахарного диабета был использован аллоксановый диабет. Инъекция аллоксана, сделанная экспериментальным животным, вызывает разрушение панкреатических бета-клеток, что приводит к нарушению выработки инсулина, и, следовательно, к развитию сахарного диабета у животных [43, 263, 264]. Первым, кто описал модель аллоксанового диабета, был Dunn и его сотрудники в 1943 году [263, 264].

В работе [126] исследовалось влияние развития сахарного диабета на внутренние органы лабораторных животных. Крысам делали инъекцию аллоксана, после чего уровень свободной глюкозы в крови повышался, у животных наблюдали полидипсию и полиурию, что характерно при гипергликемии. На 15-ый день после инъекции брались гистологические срезы тканей печени, почки, селезенки и поджелудочной железы. После анализа гистологических срезов биотканей были выявлены морфологические изменения в биотканях разной степени тяжести по сравнению с контрольной группой животных. В печени было обнаружено пониженное накопление гликогена, в почках был выявлен некроз отдельных клеток, в поджелудочной железе были обнаружены околососудистые фиброзные уплотнения, размер и количество панкреатических островков было снижено [126]. Таким образом, через две недели после инъекции аллоксана животным можно детектировать структурные изменения, вызванные развитием сахарного диабета.

В настоящих экспериментальных исследованиях развитие диабета было вызвано путем однократной инъекции дозы аллоксана экспериментальным животным после четырехчасового голодания. Для получения аллоксана 1 г мочево́й кислоты (TCI Europe NV, Токио, Япония) постепенно добавляли к 2.5 мл азотной кислоты (Sinopharm Chemical Reagent Co. Ltd.), каждый раз тщательно перемешивая. Образовавшиеся кристаллы аллоксана отфильтровывали, после чего их растворяли в теплой дистиллированной воде в соотношении 1:1.5 (температура воды не выше 60°C). Теплый раствор отфильтровывали в чашку, затем смесь сушили с помощью фена. Процедуру с добавлением воды и сушкой смеси повторяли еще один раз. Полученные кристаллы аллоксана добавляли к физиологическому раствору в соотношении 85 мг аллоксана к 2 мл физиологического раствора и вводили подкожно мышам с расчетом 212 мг/кг массы тела.

Уровень глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены мышей, измеряли после голодания до инъекции аллоксана, на 4-й день после инъекции и в день эксперимента (на 11-й день после инъекции) с помощью глюкометра "Accu-Chek Active". Средние значения уровня свободной глюкозы в крови до введения аллоксана, на 4-й день после инъекции и в день эксперимента составляли 127 ± 18 , 276 ± 105 и 322 ± 120 мг/дл, соответственно.

Так как аллоксан вызывает гипергликемию через 1-3 дня после инъекции [265], было получено достаточное увеличение уровня свободной глюкозы в крови на 4-й день после инъекции аллоксана. Предполагалось, что за 11 дней гипергликемия может привести к частичному видоизменению ткани, и фактически были получены изменения свойств ткани в диабетической группе животных по сравнению с контрольной группой. За этот период времени в используемой животной модели были реализованы преддиабетические условия. С диагностической точки зрения, особенно ценно обнаружить именно начальные изменения в тканях кожи, связанных с развитием диабета на ранней стадии с помощью оптических методов.

3.1.3 Экспериментальная установка и метод измерения

Измерения коллимированного пропускания образцов кожи выполнялись с использованием спектрометра USB4000-VIS-NIR (Ocean Optics, США). Образец закрепляли на пластиковую пластину с отверстием в середине пластины, помещали в кювету с раствором глюкозы, кювета располагалась между двумя оптическими волокнами (QP600-2-VIS-NIR, Ocean Optics, США) с диаметром сердцевины 600 мкм с коллиматорами 74-UV (Ocean Optics, США). Галогенная лампа (HL-2000) использовалась в качестве источника излучения. Схема экспериментальной установки представлена на рисунке 1. Спектры коллимированного пропускания регистрировались каждые 15-60 секунд в течение 6-10 минут в спектральном диапазоне 500-900 нм, измерения проводились при комнатной температуре $\sim 20^\circ\text{C}$.

Для каждой концентрации раствора глюкозы были исследованы двадцать образцов кожи, десять из них были взяты от контрольной группы мышей, которым не вводился аллоксан, и десять образцов были взяты от мышей, больных сахарным диабетом.

3.1.4 Измерение геометрических параметров нативной кожи при оптическом просветлении растворами глюкозы разной концентрации

До помещения образцов нативной кожи (взятой у контрольной группы мышей) в растворы глюкозы производилось измерение веса образцов, а также запись изображений интактных образцов кожи на фотокамеру, затем образцы помещались в раствор на 20-50 секунд,

после чего вновь производились измерения и запись. Измерения продолжались в течение 15-20 минут и проводились на 30 образцах кожи здоровых мышей под действием 30%-, 43%- и 56%-раствора глюкозы, по 10 образцов для каждого раствора. Вес образцов кожи измерялся во время воздействия на них растворов глюкозы с использованием весов (PL203, Mettler Toledo, Китай) с точностью 1 мг.

С помощью конфокального микроскопа (FV 1000, Olympus, Япония) измерялась толщина образцов кожи здоровых мышей во время воздействия на них растворов глюкозы. Образец кожи помещали на стеклянную подложку стороной эпидермиса и измеряли толщину интактного образца. После этого на образец наносили раствор глюкозы так, чтобы полностью покрыть его поверхность.

Для вычисления площади образца его помещали на тест-объект со шкалой и фотографировали с помощью цифровой камеры. Площадь образца получали методом, описанным в пункте 2.1.3. На рисунке 14 представлены типичные изображения образца кожи на всех этапах обработки.

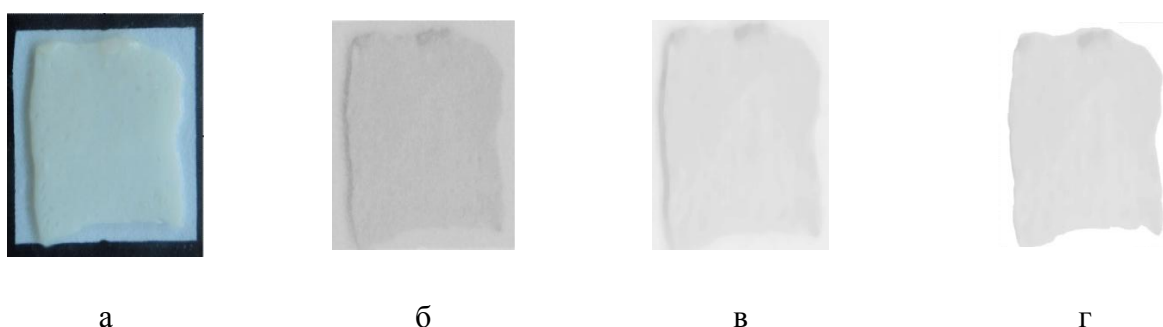


Рисунок 14. Цифровое изображение образца кожи (а), разложенное на оттенки (б), обработанное медианным фильтром (в), результат цифровой обработки изображения (г).

Коэффициент диффузии глюкозы в контрольной и диабетической коже вычислялся способом, описанным в п.п. 2.1.4 с учетом кинетики изменения толщины и площади образцов кожи мыши, а также вторым способом с использованием уравнений 27, 28, 31. Характеристическое время диффузии τ и максимальное пропускание коллимированного света через образцы контрольной и диабетической кожи $T_{\max} - T_0$, помещенные в растворы глюкозы, были определены путем аппроксимации нормированной кинетики изменения коллимированного пропускания кожи $T(t)$ на разных длинах волн, измеренного при оптическом просветлении раствором глюкозы, уравнением 5.

3.2 Результаты и обсуждение

Измерения кинетики изменения толщины, площади и веса образцов кожи во время их иммерсии в растворах глюкозы (рис. 15) были использованы для более точной оценки коэффициента диффузии глюкозы в коже. Под действием глюкозы вес, толщина и площадь образцов кожи уменьшались. Наблюдается нелинейная зависимость изменения параметров от концентрации раствора глюкозы. При сравнении изменения параметров образцов под действием 30%- и 56%-растворов глюкозы можно видеть, что 56%-раствор глюкозы приводит к более выраженной дегидратации и поперечному сжатию образцов кожи. Однако 43%-раствор глюкозы обеспечивает некоторую специфичность по своему действию на образец, вызывая менее сильное уменьшение толщины (меньшее поперечное сжатие) и веса (меньшую дегидратацию) образцов, но более сильное уменьшение площади образцов (большее продольное сжатие).

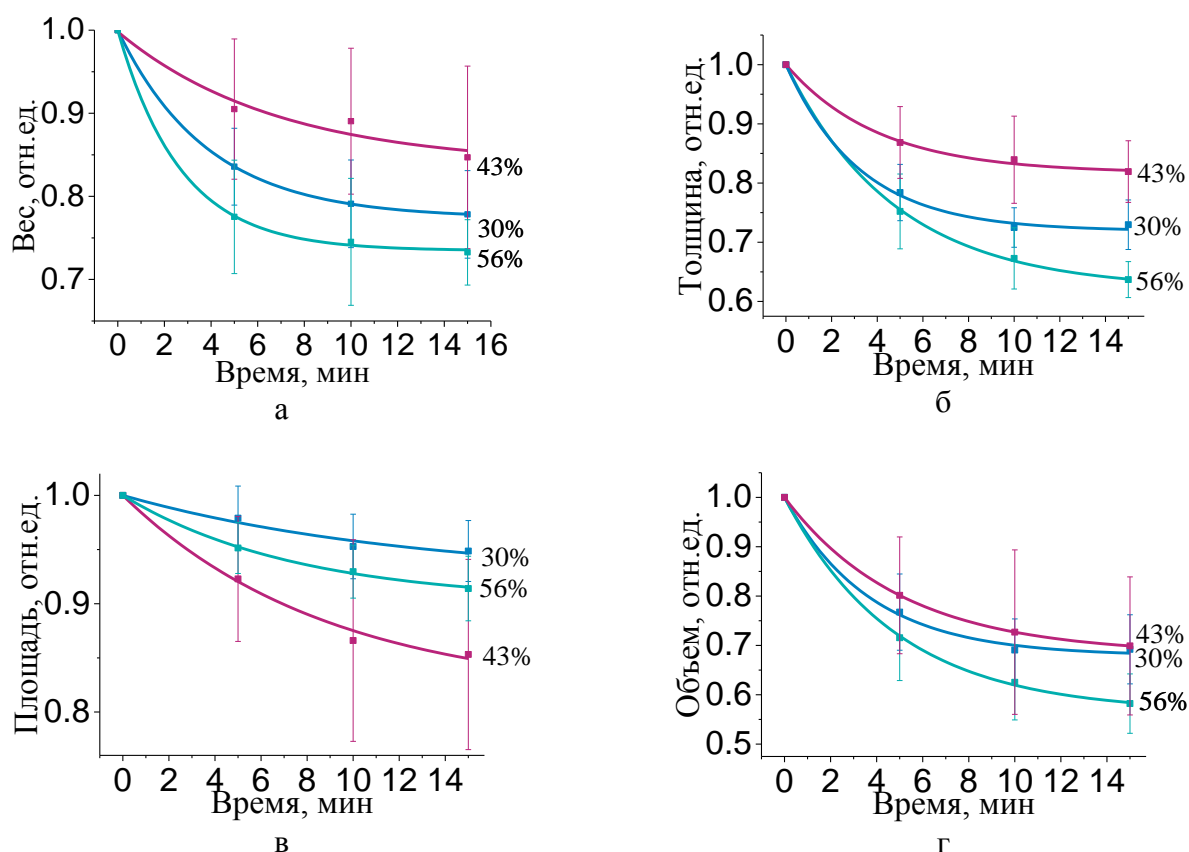


Рисунок 15. Кинетика изменения веса (а), толщины (б) площади (в) и объема (г) образцов недиабетической кожи под действием 30%-, 43%- и 56%- растворов глюкозы.

В Таблице 17 представлены кинетические параметры дегидратации, степени поперечного и продольного сжатия, полученные в результате аппроксимации временных

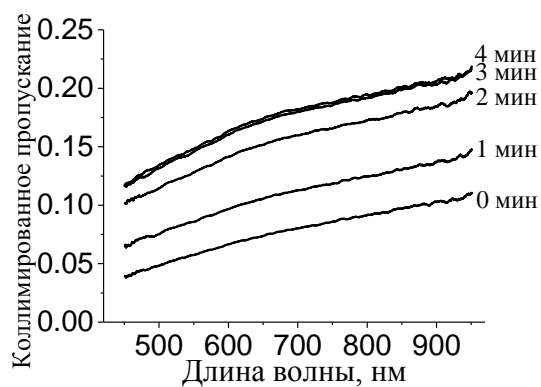
зависимостей веса, толщины, площади и объема образцов недиабетической кожи с использованием уравнения 9.

Таблица 17. Параметры дегидратации, полученной из кинетики изменения веса образцов контрольной кожи, степени «поперечного сжатия», полученной из кинетики изменения толщины образцов контрольной кожи, и степени «продольного сжатия», полученной из кинетики изменения площади образцов контрольной кожи

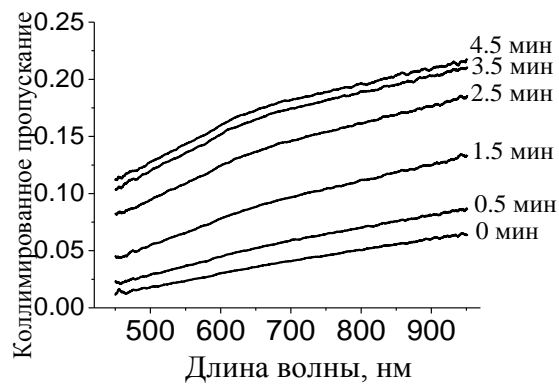
Раствор глюкозы	Дегидратация (Вес)		Поперечное сжатие (Толщина)		Продольное сжатие (Площадь)	
	A_D^W	τ_D^W , мин	A_D^l	τ_D^l , мин	A_D^S	τ_D^S , мин
30%	0.23±0.01	4.51±0.61	0.27±0.01	2.75±0.21	0.07±0.04	12.20±12.00
43%	0.16±0.01	5.86±1.10	0.16±0.01	3.10±0.42	0.17±0.01	6.80±1.40
56%	0.27±0.02	2.91±0.87	0.37±0.01	4.28±0.40	0.09±0.01	7.20±0.20

Для оценки эффективности оптического просветления образцов кожи контрольных и диабетических мышей, коэффициентов диффузии глюкозы в коже, коэффициентов проницаемости кожи для глюкозы, характеристического времени диффузии глюкозы в коже, максимального пропускания коллимированного света через образцы кожи использовались данные коллимированного пропускания контрольных и диабетических образцов кожи *ex vivo*, полученные во время иммерсии образцов в растворах глюкозы разной концентрации.

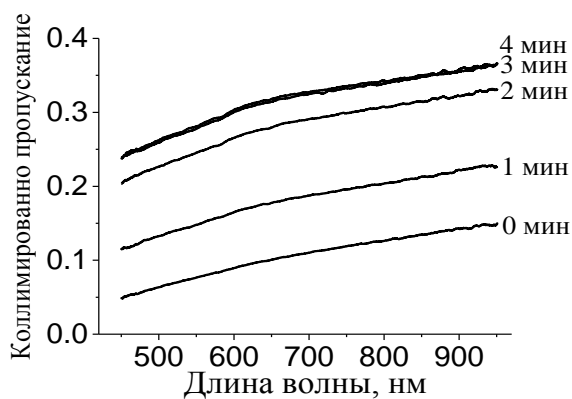
Типичные спектры коллимированного пропускания трех контрольных и трех диабетических образцов кожи, погруженных в 30%-, 43%-, и 56%- растворы глюкозы представлены на рисунке 16 слева и справа, соответственно. Результаты количественных оценок и усреднений с учетом разницы в толщине для 60 исследуемых образцов представлены в таблицах ниже. Видно, что изначально образцы плохо пропускают свет. Как для здоровых, так и для диабетических образцов кожи коллимированное пропускание увеличивается с длиной волны в исследуемом спектральном диапазоне от 450 до 950 нм. Образцы кожи обескровлены, поэтому не наблюдается полоса поглощения гемоглобина, в основном на форму спектра пропускания оказывает влияние рассеяние света. Спектры показывают меньшее светопропускание в диапазоне более коротких длин волн, что можно объяснить более высоким рассеянием биоткани и снижением рассеяния и поглощения с увеличением длины волны [266]. Измеренные спектры были использованы для получения кинетики коллимированного пропускания образцов кожи (рис. 17).



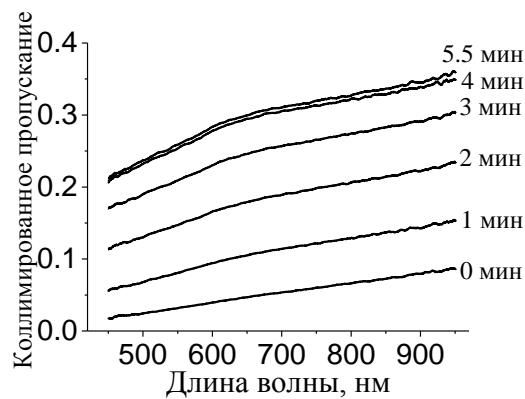
а



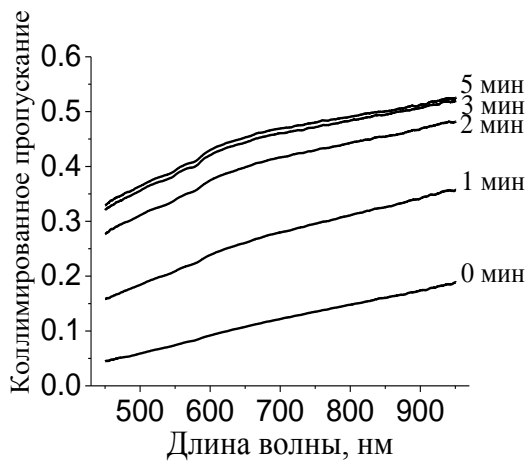
б



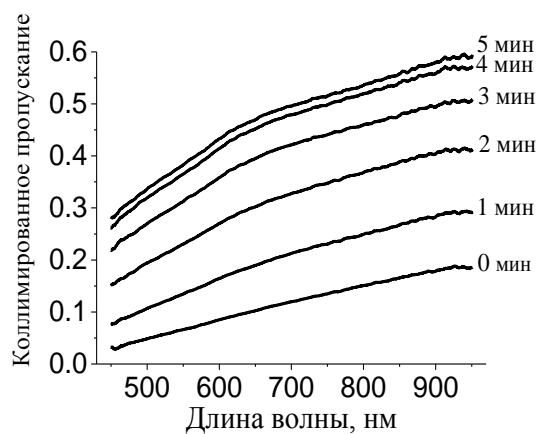
в



г



д



е

Рисунок 16. Спектры коллимированного пропускания здоровых (а, в, д) и диабетических (б, г, е) образцов кожи во время их иммерсии в водных 30%- (а, б), 43%- (в, г), и 56%- (д, е) растворах глюкозы, измеренные в разные моменты времени.

Типичные временные зависимости коллимированного пропускания шести образцов кожи (трех контрольных и трех диабетических), помещенных в 30%-, 43%- и 56%-раствор глюкозы, измеренных на разных длинах волн, представлены на рисунке 17. Для обоих типов кожи

коллимированное пропускание возрастает со временем (оптическое просветление кожи), т.е. затухание света в коже уменьшается. Коллимированное пропускание образцов кожи увеличивается за счет дегидратации ткани, вызванной осмотическими свойствами глюкозы, и согласования показателей преломления коллагеновых волокон и ВТЖ, вызванным диффузией глюкозы в межтканевое пространство [16, 28, 192-200, 211]. Коллимированное пропускание со временем достигает насыщения, указывающее на насыщение диффузионных процессов в системе и установление некоторого состояния равновесия между индуцированными потоками глюкозы и воды. Такое временное поведение оптических свойств с последующим насыщением хорошо соответствует ранее опубликованным данным [211], где взаимосвязь между просветляющей способностью, дегидратацией и толщиной образцов свиной кожи была исследована во время действия нескольких гиперосмотических ОПА. В целом кинетика коллимированного пропускания кожи аналогична тем, которые были получены ранее в главе 2, в различных работах [26, 33, 59, 60, 132, 218]. Данные, представленные на рисунках 16, 17 и в таблицах 17, 18, 19 дают информацию о различии эффективности оптического просветления и диффузионных свойств диабетической и контрольной кожи. Из приведенных графиков (рис. 16, 17) видно, что насыщение оптического просветления образца диабетической кожи наступает после немного большего времени (5-6 минут) по сравнению с контрольной кожей (около 3 мин).

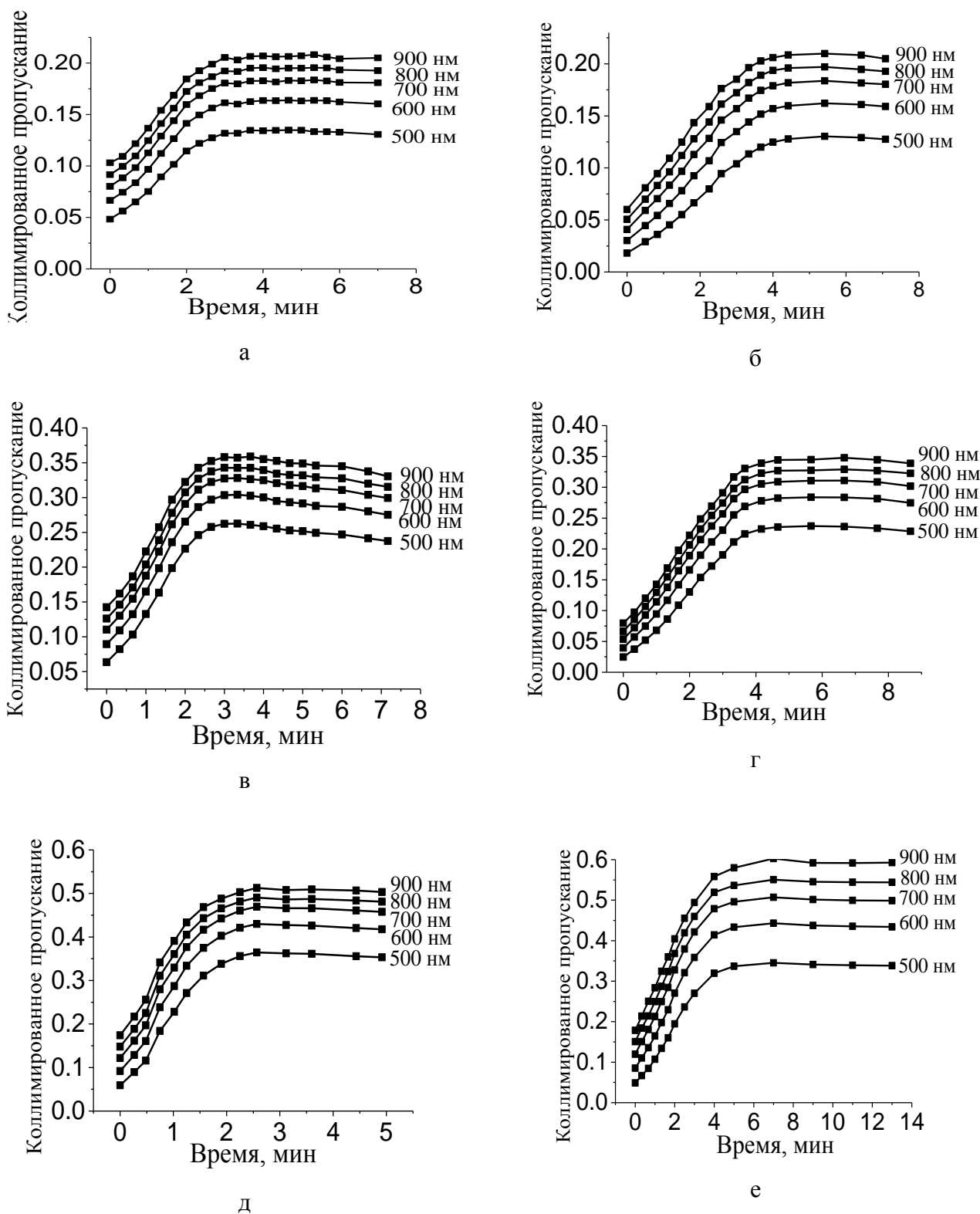


Рисунок 17. Кинетика коллимированного пропускания контрольных (а, в, д) и диабетических (б, г, е) образцов кожи во время их иммерсии в 30%- (а, б), 43%- (в, г), и 56%- (д, е) растворах глюкозы, полученная на разных длинах волн

Эффективность оптического просветления контрольной и диабетической кожи мыши была найдена двумя способами, с использованием уравнений 6 и 7. В таблице 18 представлены

значения эффективности оптического просветления контрольной и диабетической кожи мыши, полученные двумя способами. Графически зависимость эффективности ОП кожи контрольных и диабетических мышей представлена на рисунке 18 в виде гистограммы.

Таблица 18. Эффективность оптического просветления контрольной и диабетической кожи мыши, полученная двумя способами

Концентрация раствора глюкозы	$\frac{T_{\max} - T_0}{T_0}$	$\frac{\mu_{s0} - \mu_{s\min}}{\mu_{s0}}$
Здоровая кожа		
30%	2.26±0.65	0.34±0.07
43%	2.84±1.58	0.52±0.09
56%	6.91±2.95	0.62±0.04
Диабетическая кожа		
30%	4.82±1.86	0.42±0.06
43%	4.46±1.73	0.51±0.05
56%	9.07±3.80	0.53±0.12

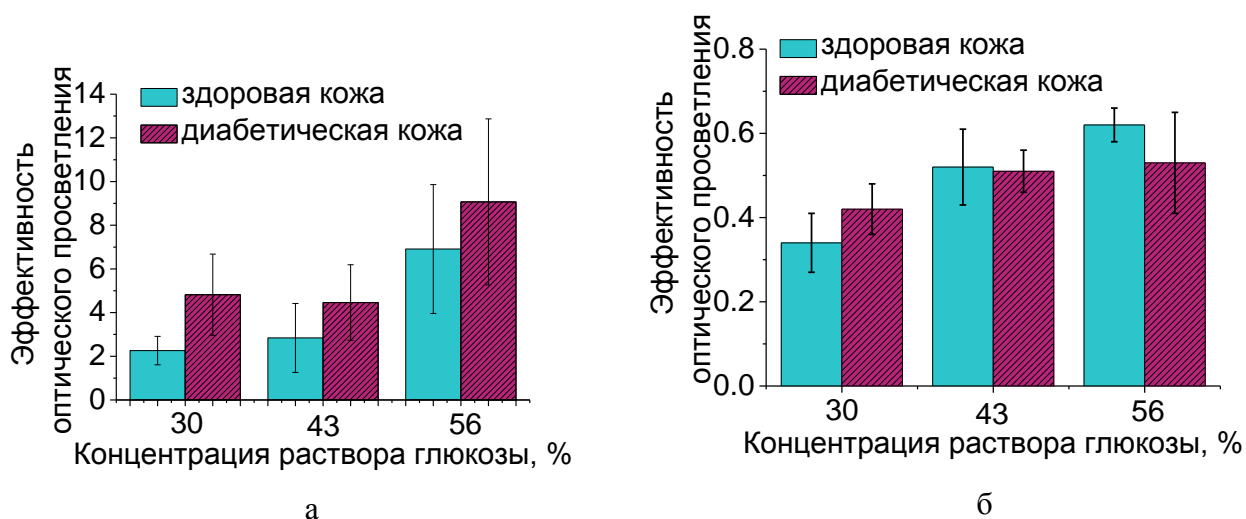


Рисунок 18. Зависимость эффективности ОП образцов контрольной и диабетической кожи мыши от концентрации раствора глюкозы, полученная двумя способами, с использованием уравнений 6 (а) и 7 (б)

Использование растворов с более высокой концентрацией глюкозы приводит к большему оптическому просветлению контрольной и диабетической кожи. Приведенные ниже (табл. 19) значения максимального пропускания кожи растут с увеличением концентрации раствора

глюкозы в обоих случаях. В данных исследованиях были получены более низкие начальные значения коллимированного пропускания диабетической кожи, по сравнению со здоровой кожей аналогичной толщины. Это соответствует результатам Kim и др. [9], где был показан рост рассеяния и диффузного отражения гликированного сухожилия человека. Таким образом, мы также подтвердили, что диабетическая ткань (кожа) является более светорассеивающей по сравнению с контрольной тканью. Разное отражение света от контрольной и диабетической кожи, вызванное гликированием белка также обсуждается в обзоре [15]. Изменение оптических свойств кожи было вызвано её структурной модификацией. Было показано, что гликирование приводит к потере осевой упаковки фибрилл коллагена I типа из-за скручивания и искажения матрицы аддуктами гликирования [9, 10, 267, 268]. Увеличение содержания воды в коже, обнаруженное у больных сахарным диабетом [269], также может быть причиной более сильного рассеяния света в диабетической коже.

В Таблице 19 приведены усредненные экспериментальные данные, полученные для образцов диабетической и контрольной кожи: толщина образцов l до и после измерений коллимированного пропускания, коэффициенты диффузии глюкозы в коже, рассчитанные с использованием описанного выше комплексного (уравнения 11-35) D_{comp} и простого (уравнения 27, 28, 31) D_{simpl} алгоритмов, соответственно; соответствующие коэффициенты проницаемости P и P_1 кожи для глюкозы; значения времени диффузии глюкозы τ , и максимального пропускания света образцами кожи $T_{\text{max}} - T_0$.

Таблица 19. Коэффициенты диффузии глюкозы в коже мыши; соответствующие коэффициенты проницаемости, время диффузии; толщина образцов до и после иммерсии кожи в растворах глюкозы; максимальное пропускание образцов

Раствор глюкозы	D_{comp} (см ² /сек) / P_{comp} (см/сек)	D_{simpl} (см ² /сек) / P_{simpl} (см/сек)	τ (мин)	l (см) (до/после)	$T_{\text{max}} - T_0$
Здоровые мыши					
30%	$(2.87 \pm 1.53) \times 10^{-6}$ / $(1.15 \pm 0.61) \times 10^{-4}$	$(2.60 \pm 1.15) \times 10^{-6}$ / $(1.04 \pm 0.46) \times 10^{-4}$	1.99 ± 1.36	0.027 ± 0.005 / 0.023 ± 0.005	0.130 ± 0.047
43%	$(2.70 \pm 2.22) \times 10^{-6}$ / $(1.29 \pm 1.06) \times 10^{-4}$	$(2.36 \pm 1.85) \times 10^{-6}$ / $(1.12 \pm 0.88) \times 10^{-4}$	1.88 ± 0.96	0.023 ± 0.005 / 0.019 ± 0.005	0.336 ± 0.109
56%	$(1.40 \pm 0.96) \times 10^{-6}$ / $(8.24 \pm 5.64) \times 10^{-5}$	$(1.26 \pm 0.86) \times 10^{-6}$ / $(7.41 \pm 5.06) \times 10^{-5}$	2.15 ± 0.88	0.019 ± 0.005 / 0.015 ± 0.005	0.334 ± 0.044

Диабетические мыши					
30%	$(1.06 \pm 0.55) \times 10^{-6} /$ $(5.43 \pm 2.82) \times 10^{-5}$	$(1.03 \pm 0.44) \times 10^{-6} /$ $(5.28 \pm 2.26) \times 10^{-5}$	2.87 ± 0.68	$0.021 \pm 0.005 /$ 0.018 ± 0.005	0.160 ± 0.033
43%	$(1.15 \pm 0.63) \times 10^{-6} /$ $(5.90 \pm 3.23) \times 10^{-5}$	$(9.10 \pm 5.14) \times 10^{-7} /$ $(4.67 \pm 2.64) \times 10^{-5}$	2.98 ± 1.88	$0.020 \pm 0.005 /$ 0.019 ± 0.005	0.210 ± 0.032
56%	$(1.02 \pm 0.44) \times 10^{-6} /$ $(6.58 \pm 2.84) \times 10^{-5}$	$(8.83 \pm 4.42) \times 10^{-7} /$ $(5.70 \pm 2.85) \times 10^{-5}$	2.80 ± 1.54	$0.017 \pm 0.005 /$ 0.014 ± 0.005	0.258 ± 0.092

На рисунке 19 представлены коэффициенты диффузии глюкозы в коже диабетических и контрольных мышей, рассчитанные с помощью комплексного и простого алгоритмов, в виде гистограммы. Нужно отметить, что комплексный алгоритм и более простой алгоритм дают близкие результаты и позволяют доказать гипотезу, что при сахарном диабете глюкоза диффундирует в коже медленнее (до 2.5 раз), чем в здоровой коже. Так как коэффициенты диффузии, полученные двумя способами, хорошо коррелируют между собой, «простая» технология вычисления коэффициента диффузии может использоваться в случае, когда необходима быстрая оценка коэффициентов диффузии или проницаемости.

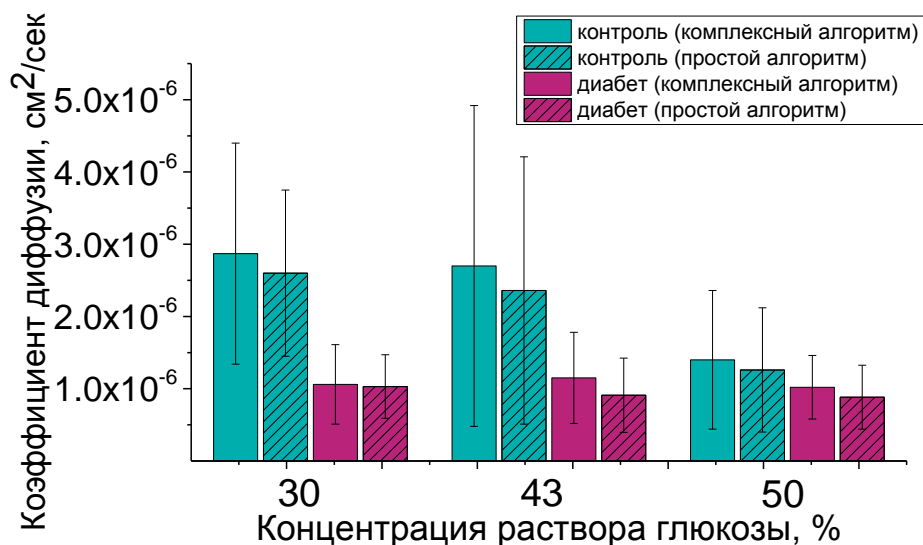


Рисунок 19. Коэффициенты диффузии глюкозы в коже диабетических и контрольных мышей, рассчитанные с помощью комплексного и простого алгоритмов

Из таблицы 19 и рисунка 19 видно, что меньшие значения коэффициента диффузии глюкозы и, соответственно, коэффициента проницаемости кожи для глюкозы были получены для диабетической кожи для каждой используемой концентрации раствора. Сильный разброс значений коэффициента диффузии в случае использования 43%-раствора глюкозы можно

объяснить индивидуальными особенностями кожи исследуемой группы мышей. Наиболее явное отличие скорости диффузии глюкозы в диабетической и контрольной коже получено при использовании 30%-раствора глюкозы. Более медленная диффузия глюкозы в диабетической коже, полученная в исследовании, может быть связана с модификацией структуры биотканей в диабетических условиях - изменением упаковки фибрилл, образованием сшивок у белков и изменением содержания свободной и связанной воды в коже.

Коэффициент диффузии уменьшается с увеличением концентрации раствора глюкозы как в случае здоровой, так и в случае диабетической кожи, однако для здоровой кожи эта зависимость выражена более ярко. Зависимость коэффициента диффузии в коже от концентрации глюкозы в растворе указывает на причастность к этому потока воды, который должен быть различным для разных растворов в связи с соотношением между свободной и связанной водой в здоровой биоткани. Примерно в два раза более медленная диффузия глюкозы при концентрации раствора глюкозы 56% относительно 30%- и 43%-растворов может означать, что при данной концентрации может быть обеспечено равновесие водных потоков [59, 60] из кожи и из раствора внутрь кожи. Увеличение времени диффузии τ с ростом концентрации раствора может быть связано с общим содержанием воды в коже (~54-60%) [67-69, 70]. Особое соотношение свободной и связанной воды в коже также должно играть свою роль. Количество свободной/слабо-связанной воды в коже можно оценить как 38-44% [67-70], что сравнимо с содержанием воды в 56%-растворе глюкозы. В данном случае соотношения содержания воды в биоткани и в используемом растворе, вода не должна сильно перемещаться, а медленная диффузия может быть связана именно с молекулами глюкозы, так как молекулы воды диффундируют быстрее, чем глюкоза, их включение в диффузию должно быть небольшим.

Для диабетической кожи видна более слабая зависимость коэффициента диффузии глюкозы от концентрации раствора, что может быть связано с большим количеством свободной/слабо-связанной воды в патологической коже и ее способностью превращаться из связанной/слабо-связанной в свободную в ответ на осмотическое давление, создаваемое применяемыми растворами глюкозы [64, 65]. Если содержание воды в коже увеличивается при диабете [269], то количество свободной воды может расти и приблизиться к содержанию воды в 43%-растворе глюкозы, который показывает большее характеристическое время диффузии τ (см. таблицу 19).

Увеличение концентрации раствора приводит к росту эффективности оптического просветления и снижению коэффициента диффузии глюкозы. Это говорит о том, что применение более концентрированных растворов глюкозы позволяет достигнуть более сильного оптического эффекта просветления, но оптическое просветление длится дольше, потому что процесс диффузии занимает больше времени из-за дополнительного воздействия глюкозы на

биоткань. В работе [204] также было получено более эффективное оптическое просветление склеры быка 45%-раствором глюкозы по сравнению с 30%-раствором глюкозы.

Нелинейное поведение эффективности оптического просветления кожи и времени диффузии (таблицы 18 и 19) в зависимости от концентрации глюкозы можно также объяснить специфичной реакцией кожной ткани на растворы глюкозы разной концентрации по отношению к содержанию воды в коже. Oliveira и соавт. [59] показали нелинейную зависимость времени диффузии глюкозы в мышечной ткани от концентрации глюкозы в растворе. Частичный вклад в нелинейность этих параметров вносит поперечное и продольное сжатие биоткани, которые в разной степени выражены при использовании растворов глюкозы разных концентраций (таблица 17).

Так как ткань кожи содержит большое количество воды, коэффициент диффузии глюкозы в коже следует сравнить с коэффициентом диффузии глюкозы в воде. При низкой концентрации глюкозы коэффициент диффузии глюкозы в воде составляет $D_{\text{глюкоза/вода}} = 6.7 \times 10^{-6} \text{ см}^2/\text{сек}$ при температуре 25°C [270], что в несколько раз больше, чем измеренный коэффициент диффузии глюкозы в коже (таблица 19). Замедление диффузии глюкозы в коже является результатом взаимодействия глюкозы с компонентами биоткани (тканевым матриксом), которое, по-видимому, сильнее выражено в диабетической коже.

По сравнению с коэффициентом диффузии глюкозы в мышечной ткани, который был определен как $8.36 \times 10^{-7} \text{ см}^2/\text{сек}$ в работе [59] в случае использования 40%-раствора глюкозы, значения, полученные в этом исследовании при воздействии 43%-раствором глюкозы на кожу ($(2.70 \pm 2.22) \times 10^{-6} \text{ см}^2/\text{сек}$), примерно в три раза больше. Это может быть вызвано меньшим содержанием воды в коже и ее многослойной структурой с градиентом концентрации воды между слоями кожи, а также специфичностью структуры мышечных клеток. Тем не менее, кинетика оптического просветления обоих типов тканей аналогична.

3.3 Основные результаты исследований

Представленные результаты показывают, что растворы глюкозы можно использовать для управления оптическими свойствами тканей кожи. При этом наблюдаются различия в реакции диабетической и здоровой кожи на растворы глюкозы. Было обнаружено, что оптическое просветление диабетической кожи более замедленно по сравнению со здоровой кожей. Значение коэффициента диффузии уменьшается с увеличением концентрации раствора как в случае диабетической, так и в случае здоровой кожи.

Подтверждено, что кинетика диффузии экзогенного агента в различных тканях, связана с участием воды ткани в процессе диффузии и зависит от соотношения между свободной/слабо-связанной водой и водой, связанной с белком, в определенной ткани [59, 60, 70].

На ранней стадии развития патологии, оптические свойства кожи не столь чувствительны к гликированию, однако, можно видеть различие диффузионных свойств между здоровой и диабетической кожей. Предложенный способ измерения оптического пропускания кожи при диффузии глюкозы чувствителен к изменениям структурных свойств тканей; в качестве индикатора используется характеристическое время диффузии агента в ткань.

Глава 4. Исследование диффузии глицерина в нативной и диабетической коже и сердечной мышечной ткани *ex vivo*

Целью работы является сравнительное исследование диффузионных свойств кожи и миокарда *ex vivo* крыс диабетической и контрольной групп путем определения коэффициентов диффузии глицерина в диабетической и недиабетической коже *ex vivo*.

4.1 Материалы и методы

В исследованиях использовались образцы кожи и сердечной мышечной ткани, взятые от белых беспородных лабораторных крыс самцов весом 500 г. Образцы кожи получали способом, описанным в главе 2. Образцы сердечной мышцы были получены с помощью скальпеля после предварительной заморозки сердца крысы. Перед проведением измерений образцы мышечной ткани промывались в физиологическом растворе для удаления крови из образцов. Всего было исследовано 40 образцов биотканей: по 20 образцов каждой биоткани, 10 из которых были взяты от диабетических крыс, а другие 10 – от контрольных крыс.

Развитие сахарного диабета у крыс было вызвано путем однократной внутримышечной инъекции аллоксана (Acros Organic, Belgium), смешанного с физиологическим раствором, с расчетом 10 мг аллоксана на 100 г массы тела крысы. Средние значения уровня свободной глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены, измеренные натошак с помощью глюкометра "Accu-Chek Performa" до введения аллоксана, на 7-й день после инъекции и в день эксперимента (на 15-й день после инъекции) составляли 128 ± 18 , 411 ± 131 и 350 ± 147 мг/дл, соответственно. Таким образом, уровень глюкозы в крови увеличился примерно в 3 раза, что характерно для заболевания сахарным диабетом.

В качестве ОПА использовался водный 70%-раствор глицерина ($n=1.427$).

Измерения спектров коллимированного пропускания проводились способом, описанным в главе 2. Толщину и вес образцов биотканей измеряли до и после оптического просветления. Вес образцов измерялся на электронных весах (SCIENTECH, SA210, USA) с точностью 1 мг. Толщина образцов измерялась микрометром с точностью ± 5 мкм.

4.2 Результаты и обсуждение

На рисунке 20 приведены типичные спектры коллимированного пропускания (а, в) и кинетика изменения коллимированного пропускания (б, г) образцов кожи крыс контрольной (а, б) и диабетической (в, г) групп во время оптического просветления 70%-раствором глицерина.

Коллимированное пропускание кожи увеличивается и затем достигает насыщения в обоих случаях. Однако при сравнении представленных графиков можно видеть, что для достижения приблизительно одинакового пропускания для диабетической кожи требуется больше времени.

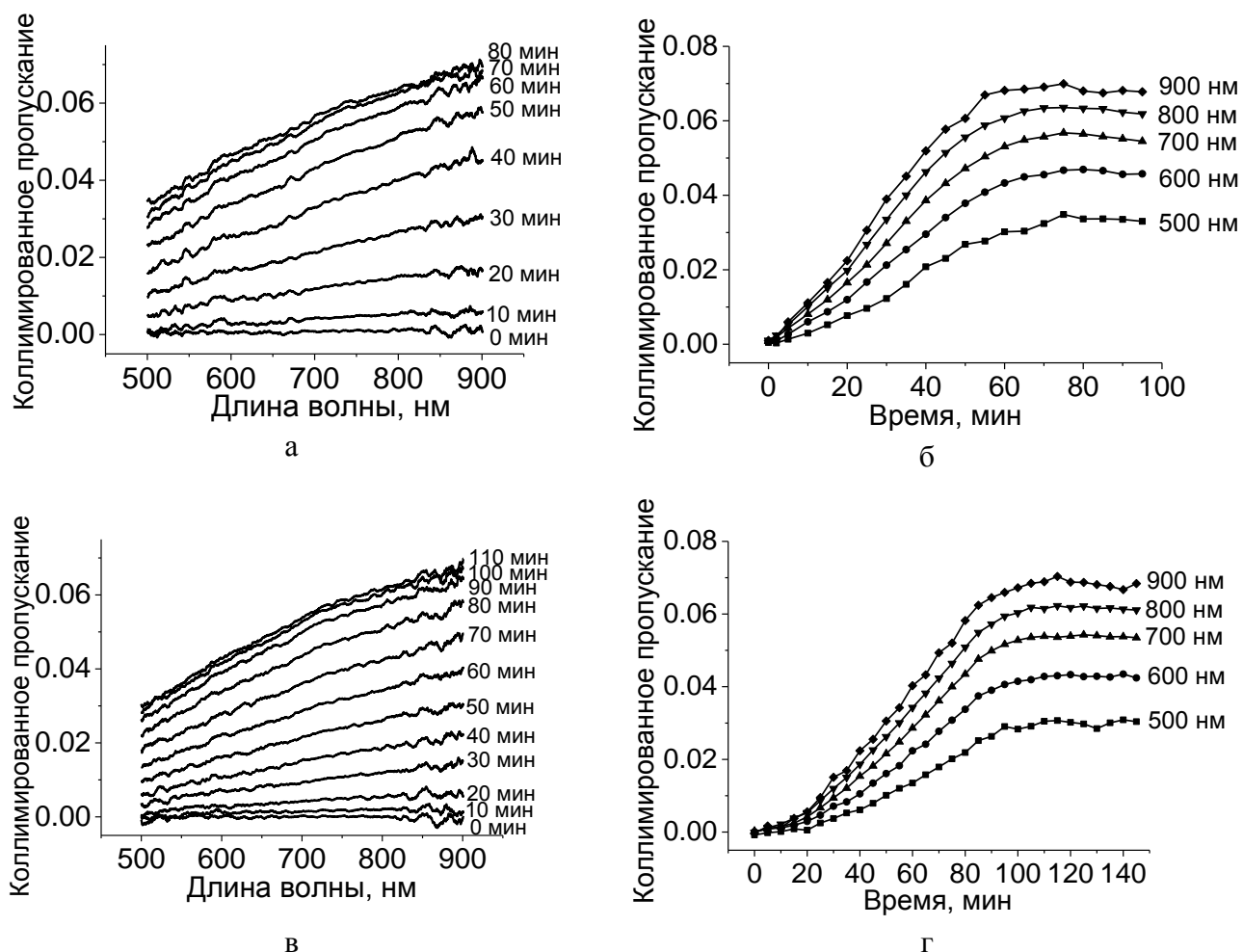


Рисунок 20. Спектры коллимированного пропускания (а, в) и кинетика изменения коллимированного пропускания (б, г) образцов контрольной (а, б) и диабетической (в, г) кожи во время оптического просветления 70%-раствором глицерина.

На рисунке 21 приведены типичные временные зависимости изменения коэффициента коллимированного пропускания образцов контрольного и диабетического миокарда. Также как и в случае кожи, в обоих случаях имеет место рост коллимированного пропускания, но оптическое просветление здорового миокарда быстрее достигает насыщения (приблизительно за 20 мин иммерсии) по сравнению с диабетическим (более чем за 30 мин); пропускание достигает при этом приблизительно одинаковых значений на соответствующих длинах волн. На длинах волн 500 нм и 600 нм коэффициент пропускания имеет относительно низкие значения,

что вызвано поглощением света миоглобином, однако и на этих длинах волн также наблюдается рост пропускания образцов в следствие оптического просветления биоткани глицерином.

На рисунке 22 представлены изображения образцов кожи и сердечной мышцы, полученные до (а, б) и после (в, г) оптического просветления в 70%-растворе глицерина. Таким образом, наглядно продемонстрирован результат оптического просветления исследуемых тканей - увеличение пропускания видимого света образцами.

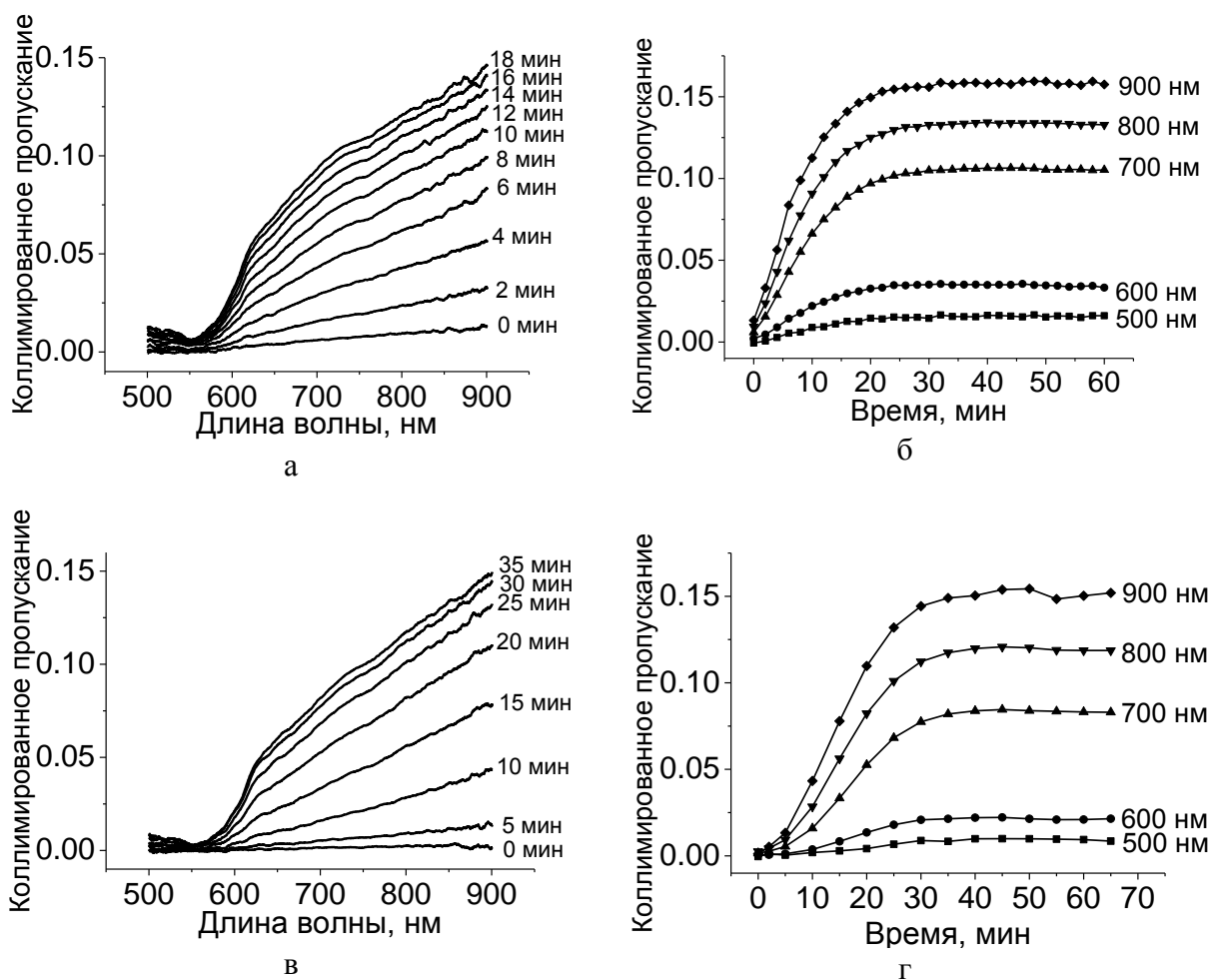


Рисунок 21. Спектры коллимированного пропускания (а, в) и кинетика изменения коллимированного пропускания (а, б) образцов контрольной (а, б) и диабетической (в, г) сердечной мышцы во время оптического просветления 70%-раствором глицерина

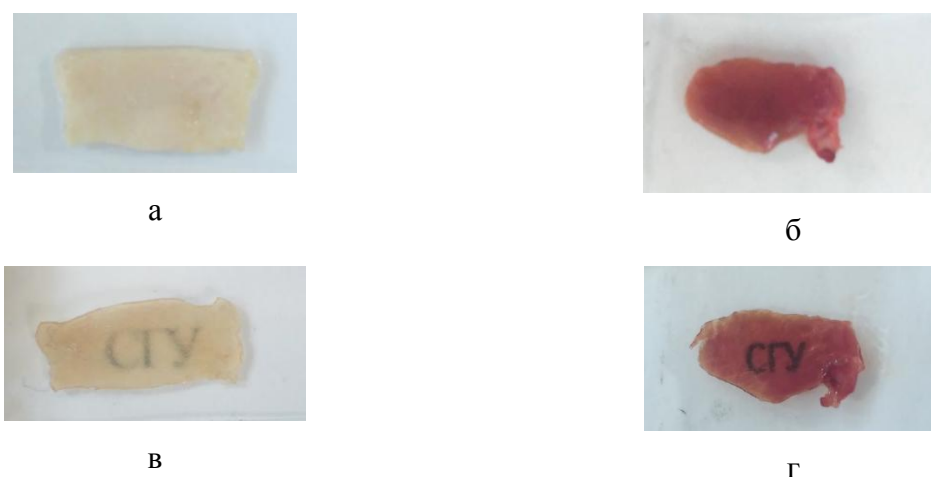


Рисунок 22. Изображения образцов кожи и сердечной мышцы до (а, б) и после (в, г) оптического просветления в 70%-растворе глицерина

В таблице 20 представлены средние значения толщины и веса образцов биотканей до (l_0 и W_0) и после (l и W) оптического просветления, коэффициентов диффузии (D) глицерина в тканях и проницаемости (P) биотканей для глицерина, эффективности оптического просветления образцов на разных длинах волн для контрольных и диабетических образцов. Коэффициенты диффузии глицерина в коже и сердечной мышечной ткани были рассчитаны из анализа кинетики коллимированного пропускания образцов, помещенных в 70%-раствор глицерина, с использованием алгоритма, описанного в п.п. 2.1.4. Коэффициенты проницаемости кожной и сердечной мышечной ткани для глицерина были найдены с помощью уравнений 36 и 37 соответственно. Степень оптического просветления кожи была получена с помощью формулы 7.

Таблица 20. Средние значения толщины и веса образцов биотканей до и после оптического просветления, коэффициентов диффузии и проницаемости глицерина в биотканях, степени оптического просветления образцов на разных длинах волн, приведенные для контрольных (к) и диабетических (д) тканей.

Ткань	к/ д	$l_0/l, \text{см}$	$W_0/W,$ мг	$D, \text{см}^2/\text{сек}$	$P, \text{см}/\text{сек}$	OC_{eff}	OC_{eff}	OC_{eff}
						(600 нм)	(700 нм)	(800 нм)
Кожа	к	$0.053 \pm 0.011 /$ 0.055 ± 0.013	$271 \pm 68 /$ 183 ± 21	$(8.33 \pm 2.60) \times 10^{-7}$	$(1.68 \pm 0.88) \times 10^{-5}$	$0.58 \pm$ 0.09	$0.56 \pm$ 0.04	$0.57 \pm$ 0.05
	д	$0.056 \pm 0.004 /$ 0.057 ± 0.007	$270 \pm 32 /$ 203 ± 73	$(6.77 \pm 2.11) \times 10^{-7}$	$(1.20 \pm 0.33) \times 10^{-5}$	$0.60 \pm$ 0.07	$0.64 \pm$ 0.04	$0.65 \pm$ 0.06

Мио- кард	к	0.068±0.011/ 0.051±0.009	210±37/ 146±35	$(7.90±3.61)×10^{-7}$	$(1.18±0.61)×10^{-4}$	0.51± 0.07	0.59± 0.06	0.61± 0.07
	д	0.058±0.006/ 0.047±0.007	214±41/ 153±36	$(5.14±2.10)×10^{-7}$	$(8.60±3.21)×10^{-5}$	0.53± 0.02	0.64± 0.05	0.66± 0.06

На рисунке 23 представлены значения коэффициентов диффузии глицерина в коже и миокарде крыс диабетической и контрольной групп в виде гистограммы.

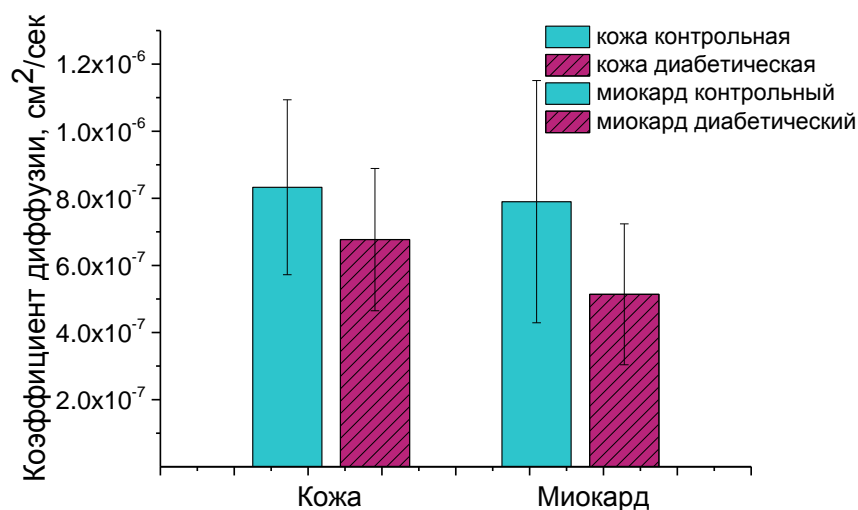


Рисунок 23. Коэффициенты диффузии глицерина в коже и миокарде крыс диабетической и контрольной групп

Измеренные коэффициенты диффузии и проницаемости принимают меньшие значения для образцов биологических тканей, взятых у крыс с модельным диабетом. Это наблюдается как для кожи так и сердечной мышцы.

Снижение скорости диффузии глицерина в биоткани при сахарном диабете может быть связано со структурными изменениями биотканей - изменением упаковки фибрилл, образованием сшивок у белков и изменением содержания свободной и связанной воды в коже [3, 4, 6, 268]. Увеличение рассеяния и диффузного отражения гликированной ткани [9] может быть вызвано образованием сшивок между фибриллами, а также их переориентацией [9, 10, 267, 268], и в то же время увеличением содержания воды в ткани [269], что в свою очередь приводит к изменению фактора упаковки рассеивателей. Такое ухудшение проницаемости ткани (вследствие формирования межфибриллярных сшивок) приводит к нарушению метаболизма, а, следовательно, к развитию более масштабных осложнений у больного сахарным диабетом, например возникновению отеков, которые могут привести к образованию гангрены.

Снижение веса и толщины образцов кожи и миокарда свидетельствует о дегидратации образцов, которая способствует их оптическому просветлению. Эффективность оптического просветления биотканей с использованием водного 70%-раствора глицерина продемонстрирована в таблице 20 в виде значений степени оптического просветления образцов на разных длинах волн.

Сравнение полученных коэффициентов диффузии глицерина в миокарде с коэффициентами диффузии других ОПА в мышечной ткани показывает применимость используемого метода для оценки скорости диффузии ОПА в биологических тканях. Различия в скорости диффузии могут быть вызваны отличием физических свойств применяемых агентов и сердечной мышечной ткани, а также используемого способа измерения скорости диффузии агента. Коэффициент диффузии глюкозы в абдоминальной мышечной ткани быка *in vitro* был получен с помощью ОКТ равным $(2.98 \pm 0.94) \times 10^{-6}$ см²/сек, причем толщина образцов в этом случае увеличилась [259]. При исследовании оптического просветления скелетной мышечной ткани водным 60%-раствором этиленгликоля был получен коэффициент диффузии воды в мышце $D_{\text{воды}} = 3.12 \times 10^{-6}$ см²/сек [96]. При использовании в качестве ОПА водного 54%-раствора глюкозы коэффициент диффузии воды в мышце равен $D_{\text{воды}} = 3.22 \times 10^{-6}$ см²/сек [96].

Проницаемость кожи для глицерина при использовании 70%-раствора глицерина $((1.68 \pm 0.88) \times 10^{-5}$ см/сек) на порядок выше полученной в *in vivo* исследованиях на коже человека $(1.67 \pm 0.04) \times 10^{-6}$ см/сек [172]. Причиной могут являться большая осмотичность 70%-раствора глицерина и разные условия проведения исследований (*in vivo* и *ex vivo*).

4.3 Основные результаты исследований

Поведение коллимированного пропускания образцов биотканей, взятых у животных контрольной и диабетической группы, при оптическом просветлении 70%-раствором глицерин схоже: сначала происходит рост пропускания света образцами, после чего рост замедляется и затем завершается. Таким образом, впервые обнаружена корреляция в поведении оптического просветления и диффузии молекул глицерина для миокарда и кожи крысы, что открывает возможность разработки метода тестирования состояния миокарда по состоянию кожи в процессе развития диабета и его лечения.

В случае диабетической кожи, в отличие от контрольной, рост пропускания происходит гораздо медленнее, хотя достигает приблизительно одинаковых значений на соответствующих длинах волн.

Для достижения приблизительно одних и тех же значений пропускания для диабетического образца миокарда требуется примерно в два раза больше времени, чем для образца, взятого у крысы, не больной диабетом.

Соответственно, скорость диффузии глицерина в диабетической коже и миокарде меньше, чем в соответствующих биотканях, полученных от животных, не имеющих сахарного диабета.

Глава 5. Исследование диффузии гиперосмотических химических агентов в коже *in vivo*

Целью данной работы являлось исследование кинетики иммерсионного просветления кожи человека *in vivo* с помощью различных оптических просветляющих агентов и определение коэффициентов диффузии агентов в коже.

5.1 Материалы и методы

5.1.1 Оптические просветляющие агенты

В качестве иммерсионных агентов в исследованиях использовались двух- и многокомпонентные растворы, представленные в таблице 21. Показатели преломления растворов измерялись на длине волны 589 нм на рефрактометре Аббе ИРФ-454Б2М (ЛОМО, Россия). Уровень pH растворов измерялся с помощью pH-метра-милливольтметра pH-410 («НПО Аквилон», г. Подольск, Россия) с погрешностью прибора ± 0.05 , а также с помощью индикаторной бумаги («Реахим», Россия). В таблице 21 приведены значения показателя преломления n на длине волны 589 нм, плотности ρ , вязкости η , осмолярности Osm , молекулярной массы Mr и pH для ОПА, используемых в исследованиях.

Таблица 21. Значения показателей преломления, плотности, вязкости, осмолярности, pH ОПА

ОПА	n	ρ , г/мл	η , сП	Osm , осмоль/л	Mr , Да	pH
Водный 40%-раствор глюкозы	1.391		63 (60 °С) [276]	2.22 (см. главу 2)	198 [231]	3
Раствор фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%)	1.408					7
Водный 60%-раствор глицерина	1.414	1.15 (20°С) [230]	11 (20°С) [230, 231]	12.48	92 [231]	4
Раствор глицерина (50%) в воде (40%) и ДМСО (10%)	1.416					6
Омнипак® (300 мг йода/мл)	1.438		12 (20°С)	0.47		7

5.1.2 Экспериментальная установка и метод измерения

Измерения проводились с помощью оптического когерентного томографа Spectral Radar OCT System OCP930SR 022 (Thorlabs Inc., США) на длине волны 930 нм. Ширина спектральной полосы составляла 100 нм, выходная мощность – 2 мВт, оптическая глубина сканирования – 1.6 мм, разрешение системы по глубине - 6.2 мкм.

Измерения проводились на участке кожи с внутренней стороны предплечья (рис. 24). Запись сканов с исследуемой области проводилась до воздействия иммерсионных агентов, затем каждые 5 минут во время действия агентов, процедура записи повторялась в течение 50 минут. В измерениях участвовало 40 добровольцев, возраст которых составлял 19-21 год.

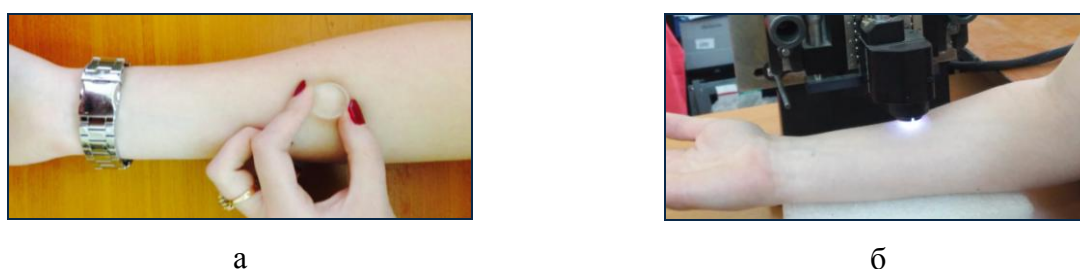


Рисунок 24. а) кювета с иммерсионной жидкостью на исследуемой области, б) запись скана с исследуемой области

5.2 Метод определения коэффициентов диффузии гиперосмотических химических агентов в биологических тканях *in vivo*

Аналогично способу, описанному в п. 2.1.4, коэффициент диффузии иммерсионной жидкости в коже *in vivo* восстанавливается по кинетике изменения коэффициента ослабления света в исследуемой области при воздействии на ее поверхность ОПА, путем минимизации целевой функции [16, 254, 255]:

$$f(D) = \sum_{i=1}^{N_t} (\mu_t^{teor}(D, t_i) - \mu_t^{exp}(t_i))^2 \quad (36)$$

где $\mu_t^{teor}(D, t_i)$ – рассчитанный коэффициент ослабления света в коже при заданном значении D в момент времени t , сек, $\mu_t^{exp}(t_i)$ – экспериментально измеренный коэффициент ослабления света в коже в момент времени t , сек, N_t – количество экспериментальных точек кинетики изменения коэффициент ослабления света в коже.

Экспериментально полученный коэффициент ослабления света μ_t^{exp} в коже в момент времени t определяется путем аппроксимации зависимости интенсивности света $I(z)$ от глубины исследуемой области z А-скана, записанного в момент времени t , уравнением [271]:

$$I(z) = A_D \exp(-\mu_t^{\text{exp}} z) + y_0. \quad (37)$$

Теоретически коэффициент ослабления определяется с использованием модели кожи, представленной в п. 2.1.4, однако в данном случае граничные условия для полубесконечной среды при решении уравнения диффузии будут иметь вид: $C(0,t)=C_0$ и $C(\infty,t)=0$, а кинетика изменения концентрации ОПА в коже будет определяться уравнением [16, 254]:

$$C(x,t) = C_0 \left(1 - \text{erf}(x/2\sqrt{Dt})\right), \quad (38)$$

где $\text{erf}(z) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^z \exp(-q^2) dq$.

Оптическая глубина когерентного зондирования (далее «глубина зондирования») $\Delta z = z_1 - z_2$ определяется из координат, при переходе между которыми интенсивность сигнала изменяется в e раз.

Эффективность просветления оценивалась с использованием уравнения 7 и экспериментально полученных коэффициентов ослабления света в коже.

В случае многокомпонентных растворов вместо коэффициента диффузии определялась скорость оптического просветления кожи, так как в используемом алгоритме определяется средняя скорость обменного потока ОПА в биоткань и воды из биоткани. Скорость оптического просветления кожи в данном случае определяется характеристическим временем диффузии агента в коже, которое получали с помощью уравнения 5, где вместо кинетики изменения коллимированного пропускания использовали кинетику изменения коэффициента ослабления света в коже.

5.3 Результаты и обсуждение

На рисунке 25 представлены типичные ОКТ-изображения исследуемых участков кожи до воздействия просветляющих агентов, через 5 и 50 минут после нанесения просветляющего агента и соответствующие зависимости коэффициента ослабления света от времени просветления кожи.

Полученные временные зависимости коэффициента ослабления света в коже человека *in vivo* при оптическом просветлении иммерсионными агентами использовались для оценки коэффициентов диффузии и скорости оптического просветления иммерсионных агентов в коже (таблица 22) и эффективности оптического просветления кожи (таблица 23).

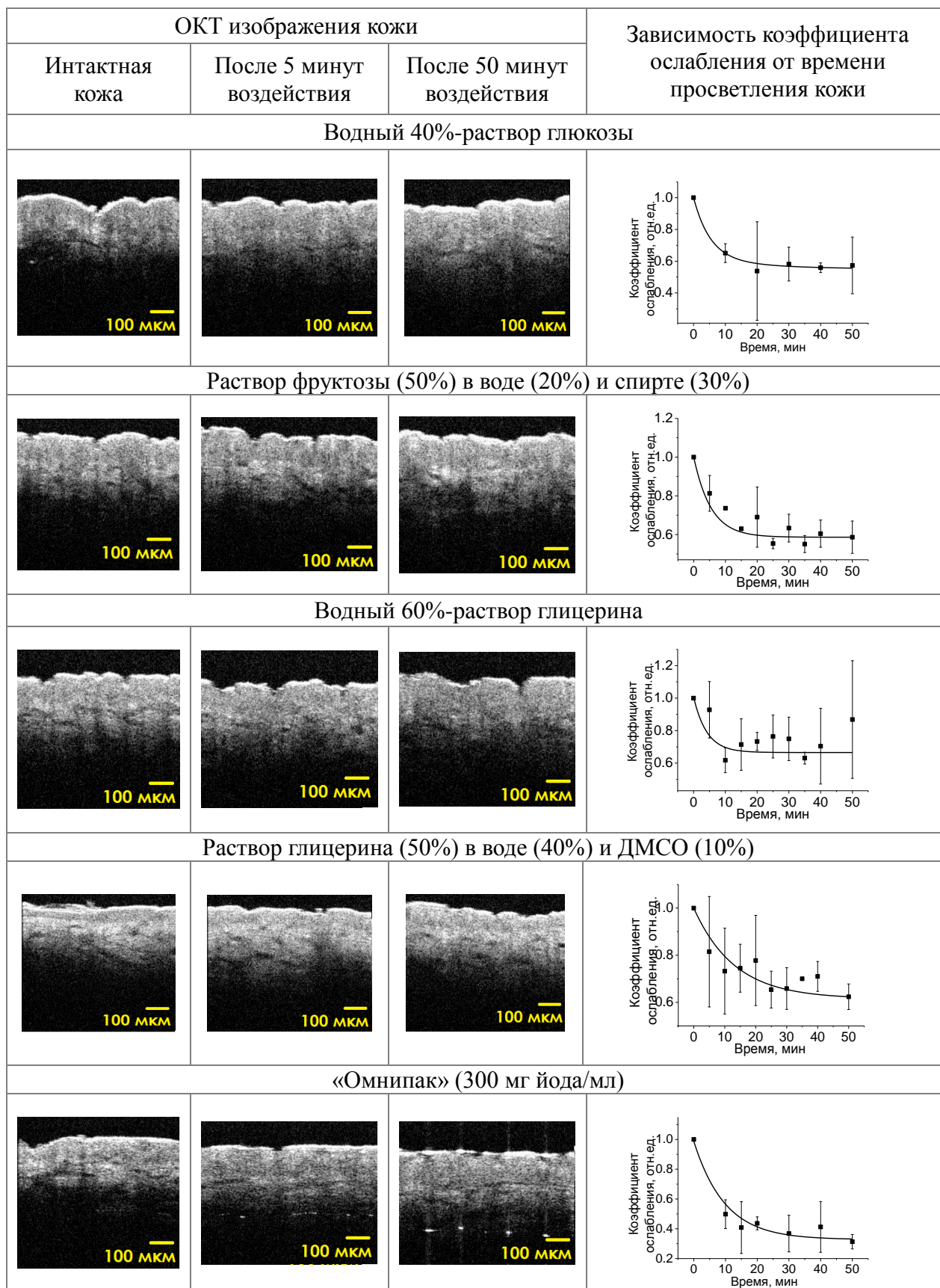


Рисунок 25. ОКТ-изображения интактной кожи, кожи после 5 и 50 минут воздействия просветляющих агентов и соответствующие графики зависимости коэффициента ослабления света от времени просветления кожи

Таблица 22. Эффективность и скорость оптического просветления кожи человека *in vivo* (коэффициент диффузии ОПА в коже), увеличение глубины зондирования кожи через 5 и 50 мин после начала ОП (0 мин)

Иммерсионный агент	Эффективность просветления (через 50 мин), %	Коэффициент диффузии, см ² /сек	Увеличение глубины зондирования кожи	
			через 5 мин	через 50 мин
Водный 40%-раствор глюкозы	27±11	$(6.69±7.17) \times 10^{-7}$	в 2 раза	в 3.14 раз
Водный 60%-раствор глицерина	32±08	$(1.46±1.14) \times 10^{-7}$	в 1.2 раза	в 1.3 раз
Омнипак® (йогексол)	36±13	$(1.06±0.56) \times 10^{-7}$	в 1.5 раза	в 3 раз

Таблица 23. Эффективность и скорость оптического просветления кожи человека *in vivo*, увеличение глубины зондирования кожи через 5 и 50 мин после начала ОП (0 мин)

Иммерсионный агент	Эффективность просветления (через 50 мин), %	Скорость оптического просветления, мин	Увеличение глубины зондирования кожи	
			через 5 мин	через 50 мин
Раствор фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%)	41±16	7±2	в 1.6 раза	в 1.2 раз
Раствор глицерина (50%) в воде (40%) и ДМСО (10%)	39±14	7±3	в 2 раза	в 1.5 раз

Из рисунка 24 видно, что после нанесения иммерсионных жидкостей на кожу глубина проникновения зондирующего излучения существенно увеличивается, что объясняется снижением рассеяния света в верхних слоях кожи. В таблицах 22 и 23 можно видеть, что при нанесении всех агентов глубина зондирования увеличивается.

В работах [222] и [164] было получено увеличение глубины зондирования кожи человека *ex vivo* и *in vivo* при применении дегидратированного глицерина и смеси пропиленгликоля и полиэтиленгликоля в 2 и 1.2 раза, соответственно [201].

На приведенных графиках коэффициент ослабления света снижается после нанесения каждого из использованных оптических просветляющих агентов, что подтверждает снижение рассеяния света в коже. Снижение рассеяния вызвано выравниванием показателей преломления рассеивателей кожи (коллагеновых, эластиновых волокон и клеточных компонентов) и

окружающей их внутритканевой жидкости вследствие диффузии в кожу иммерсионных агентов и частичной дегидратацией ткани за счет осмотических явлений.

В каждом случае эффективность и скорость снижения коэффициента ослабления света разная, что связано с различиями в физическо-химических свойствах агентов. Наиболее эффективное оптическое просветление наблюдалось при применении водно-спиртового раствора фруктозы, в то время как самую высокую скорость диффузии имеет глюкоза. Наиболее высокая эффективность раствора фруктозы скорее всего связана с присутствием в растворе спирта, который усиливает проницаемость кожи за счет нарушения поверхностного липидного слоя кожи.

Сравнение эффективности оптического просветления кожи помощью водного раствора глицерина с добавлением ДМСО показывает, что при добавлении ДМСО в раствор глицерина увеличивается как эффективность просветления, так и скорость диффузии агента в коже при том условии, что показатели преломления водного раствора глицерина и раствора глицерина в воде и ДМСО практически одинаковы. Большая эффективность водного раствора глицерина при добавлении ДМСО объясняется тем, что ДМСО эффективно разрушает липидный слой эпидермиса кожи и обеспечивает доступ иммерсионного агента в дерму.

Наименьшая эффективность просветления, вызванная водными растворами глюкозы и глицерина может быть связана с низким относительно внутритканевой жидкости кожи уровня рН растворов. Это может быть причиной притока воды из соседних областей ткани, а, следовательно, завершения процесса просветления. Также можно связать меньшую эффективность раствора глюкозы с самым низким показателем преломления раствора, который больше всех остальных отличается от показателя преломления коллагена кожи.

Коэффициент диффузии глюкозы в коже человека *in vivo* после инъекции 40%-раствора глюкозы был получен в работе [273] равным $(2.56 \pm 0.13) \times 10^{-6}$ см²/сек. При сравнении этого значения с результатом, полученным в настоящей работе нужно учитывать разные способы применения агента и проведения измерений.

5.4 Основные результаты исследований

В результате проведенных исследований были получены временные зависимости коэффициентов ослабления света и рассчитаны коэффициенты диффузии иммерсионных агентов в коже человека *in vivo*.

Все используемые химические агенты, а именно водный 40%-раствор глюкозы, раствор фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%), водный 60%-раствор глицерина, раствор глицерина (50%) в воде (40%) и ДМСО (10%), «Омнипак» (300 мг йода/мл) показали эффект

оптического просветления, чем подтвердили возможность их применения в качестве оптических просветляющих агентов.

Заключение и основные результаты

В ходе работы было показано, что оптическими свойствами сердечной мышцы (миокарда) можно управлять с помощью применения 40%-раствора глюкозы, 60%-раствора глицерина. Впервые были определены коэффициенты диффузии глюкозы и глицерина в миокарде *in vitro*. Было показано, что оптическими свойствами кожи можно управлять с помощью применения 30%-, 40%, 43%-, 56%-раствора глюкозы, 70%-раствора глицерина, ПЭГ-300, ПЭГ-400, «Омнипака» (йогексола). Были определены коэффициенты диффузии данных химических агентов в коже крыс *ex vivo*.

Были измерены зависимости веса, толщины, площади, объема, коллимированного пропускания образцов миокарда свиньи *in vitro* во время их иммерсии в водном 60%-растворе глицерина и 40%-растворе глюкозы, образцов кожи крысы *ex vivo* во время их иммерсии в 40%-растворе глюкозы, ПЭГ-300 и ПЭГ-400.

Были измерены спектры коллимированного пропускания кожи во время иммерсии в «Омнипаке» (300 мг йода/мл). Из анализа кинетики изменения измеренных величин были оценены степень дегидратации, сжатия и набухания миокарда и кожи, время диффузии агентов в исследуемых биотканях, эффективность оптического просветления образцов биотканей, коэффициенты диффузии ОПА в биотканях, коэффициенты проницаемости исследуемых биологических тканей для ОПА. Были получены степень оптического просветления и коэффициент диффузии йогексола («Омнипак») в коже.

Показано, что 40%-раствор глюкозы и 60%-раствор глицерина вызывают набухание биотканей в отличие от ПЭГ-300 и ПЭГ-400 которые не вызывают набухания при достаточно длительном воздействии.

Установлено, что оптическое просветление диабетической кожи и миокарда замедленно по сравнению со здоровой кожей, измеренные коэффициенты диффузии глюкозы меньше в диабетической коже, чем в здоровой.

Получено, что значение коэффициента диффузии уменьшается с увеличением концентрации раствора глюкозы как в случае диабетической, так и в случае здоровой кожи.

Обнаружена корреляция в поведении оптического просветления и диффузии молекул глицерина для миокарда и кожи крысы, что открывает возможность разработки метода тестирования состояния миокарда по состоянию кожи в процессе развития диабета и его лечения.

Показано, что скорость диффузии глицерина в диабетической коже и миокарде меньше, чем в соответствующих биотканях, полученных от животных контрольной группы.

В результате исследований, проведенных на оптическом когерентном томографе, были получены временные зависимости коэффициентов ослабления света и рассчитаны коэффициенты диффузии иммерсионных агентов в коже человека *in vivo*. Все используемые двух- и многокомпонентные химические агенты, а именно водный 40%-раствор глюкозы, раствор фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%), водный 60%-раствор глицерина, раствор глицерина (50%) в воде (40%) и ДМСО (10%) показали эффект оптического просветления, чем подтвердили возможность их применения в качестве оптических просветляющих агентов.

Автор выражает благодарность своему научному руководителю доценту кафедры оптики и биофотоники СГУ им. Н.Г. Чернышевского, к.ф.-м.н. Алексею Николаевичу Башкатуву за всестороннюю помощь и поддержку при выполнении данной работы, заведующему кафедрой оптики и биофотоники, д.ф.-м.н. Валерию Викторовичу Тучину за советы, поддержку, помощь в обсуждении полученных результатов, доценту кафедры оптики и биофотоники, к.ф.-м.н. Элине Алексеевне Гениной за рекомендации по выполнению исследований. Автор благодарит инженеров кафедры оптики и биофотоники Вадима Дмитриевича Генина, Полину Александровну Тимошину, сотрудников кафедры физиологии человека и животных биологического факультета СГУ им. Н.Г. Чернышевского, руководителя центра коллективного пользования ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И.Разумовского Минздрава России Аллу Борисовну Бучарскую за содействие в проведении экспериментальных исследований, а также сотрудников лаборатории им. Бриттона Чанса Хуажонгского университета науки и технологии (г. Ухань, Китай) за предоставление возможности выполнить часть работы в их лаборатории. Кроме того, автор благодарит всех сотрудников кафедры оптики и биофотоники за разностороннюю помощь при выполнении работы, а также семью и близких за терпение и понимание.

Список литературы

1. The Top 10 Causes of Death Fact Sheet №310, World Health Organization (WHO), [Электронный ресурс] — May 2014; retrieved 20 November 2014. Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
2. World Health Organization (WHO): 10 facts about diabetes [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/facts/en/index1.html>
3. Selvin E., Steffes M. W., Zhu H., Matsushita K., Wagenknecht L., Pankow J., Coresh J., Brancati F.L., Glycated Hemoglobin, Diabetes, and Cardiovascular Risk in Nondiabetic Adults // *The New England Journal of Medicine*. — 2010. — V.362, №9. — P.800–811.
4. Tseng J.-Y., Ghazaryan A. A., Lo W., Chen Y.-F., Hovhannisyan V., Chen S.-J., Tan H.Y., Dong C.-Y. Multiphoton spectral microscopy for imaging and quantification of tissue glycation // *Biomedical Optics Express*. — 2011. — V.2, №2. — P. 218–230.
5. Mazarevica G., Freivalds T., Jurka A. Properties of erythrocyte light refraction in diabetic patients // *Journal of Biomedical Optics*. — 2002. — V.7, №2. — P. 244–247.
6. Blackwell J., Katika K.M., Pilon L., Dipple K.M., Levin S.R., Nouvong A. *In vivo* time-resolved autofluorescence measurements to test for glycation of human skin // *Journal of Biomedical Optics*. — 2008. — V.13, №1.
7. Kanska U., Boratynski J. Thermal glycation of proteins by D-glucose and D-fructose // *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. — 2002. — V.50. — P. 61–66.
8. Vigneshwaran N., Bijukumar G., Karmakar N., Anand S., Misra A. Autofluorescence characterization of advanced glycation end products of hemoglobin // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. — 2005. — V.61, №1. — P. 163–170.
9. Kim B.-M., Eichler J., Reiser K.M., Rubenchik A.M., Da Silvam L.B. Collagen structure and nonlinear susceptibility: effects of heat, glycation, and enzymatic cleavage on second harmonic signal intensity // *Lasers in Surgery and Medicine* — 2000. — V.27. — P. 329–335.
10. Hull E.L., Ediger M.N., Unione A.N.T., Deemer E.K., Stroman M.L., Baynes J.W. Noninvasive, optical detection of diabetes: model studies with porcine skin // *Optics Express* — 2004. — V.12, №19. — P. 4496–4510.
11. Kinnunen J., Kokkonen H.T., Kovanen V., Hauta-Kasari M., Vahimaa P., Lammi M.J., Töyräs J., Jurvelin J.S. Nondestructive fluorescence-based quantification of threose-induced collagen cross-linking in bovine articular cartilage // *Journal of Biomedical Optics*. — 2012. — V.17, №9.
12. Gopalkrishnapillai B., Nandanatham V., Karmakar N., Anand S., Misra A. Evaluation of autofluorescent property of hemoglobin-advanced glycation end product as a long-term glycemic index of diabetes // *Diabetes*. — 2003. — V.52. — P. 1041–1046.

13. Hwang Y.-J., Granelli J., Lyubovitsky J. Multiphoton optical image guided spectroscopy method for characterization of collagen-based materials modified by glycation // *Analytical Chemistry*. — 2011 — V.83, №1. — P. 200–206.
14. Goldin A., Beckman J.A., Schmidt A.M., Creager M.A. Advanced Glycation End Products Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury // *Circulation*. — 2006. — V.114. — P. 597–605.
15. Khalil O.S. Non-Invasive Glucose Measurement Technologies: An Update from 1999 to the Dawn of the New Millennium // *Diabetes Technology & Therapeutics*. — 2004. — V.6, №5. — P. 660–697.
16. Tuchin V. V. *Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues* / V.V.Tuchin. — Taylor & Francis Group LLC, CRC Press, 2009.
17. Gniadecka M., Nielsen O. F., Wessel S., Heidenheim M., Christensen D. H., Wulf H. C. Water and protein structure in photoaged and chronically aged skin // *Journal of Investigative Dermatology*. — 1998. — V.111, №6. — P. 1129–1133.
18. Ullah H., Mariampillai A., Ikram M., Vitkin I. A. Can Temporal Analysis of Optical Coherence Tomography Statistics Report on Dextrorotatory-Glucose Levels in Blood? // *Laser Physics*. — 2011. — V.21, №11. — P. 1962–1971.
19. Purvinis G., Cameron B. D., Altrogge D. M. Noninvasive polarimetric-based glucose monitoring: an in vivo study // *Journal of Diabetes Science and Technology*. — 2011. — V.5, №2. — P. 380–387.
20. Yuen J. M., Shah N. C., Walsh J. T., Glucksberg M. R., Van Duyne R. P., Transcutaneous glucose sensing by surface-enhanced spatially offset Raman spectroscopy in a rat model // *Analytical Chemistry*. — 2010. — V.82, №20, — P. 8382– 8385.
21. Dingari N. C., Barman I., Singh G. P., Kang J. W., Dasari R. R., Feld M. S. Investigation of the specificity of Raman spectroscopy in non-invasive blood glucose measurements // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2011. — V.400, — №9. — P. 2871–2880.
22. Dingari N. C., Barman I., Kang J. W., Kong C. R., Dasari R. R., Feld M. S. Wavelength selection-based nonlinear calibration for transcutaneous blood glucose sensing using Raman spectroscopy // *Journal of Biomedical Optics*. — 2011. — V.16, №8.
23. Zhang Y., Wu G., Wei H., Guo Z., Yang H., He Y., Xie S., Liu Y. Continuous noninvasive monitoring of changes in human skin optical properties during oral intake of different sugars with optical coherence tomography // *Biomedical Optics Express*. — 2014. — V.5, №4. — P. 990–999.
24. He R. Y., Wei H. J., Gu H. M., Zhu Z. G., Zhang Y. Q., Guo X., Cai T. Effects of optical clearing agents on noninvasive blood glucose monitoring with optical coherence tomography: a pilot study // *Journal of Biomedical Optics*. — 2012. — V.17, №10.

25. Pleitez M. A., Lieblein T., Bauer A., Hertzberg O., von Lilienfeld-Toal H., Mäntele W. Windowless ultrasound photoacoustic cell for in vivo mid-IR spectroscopy of human epidermis: Low interference by changes of air pressure, temperature, and humidity caused by skin contact opens the possibility for a non-invasive monitoring of glucose in the interstitial fluid // *Review of Scientific Instruments*. — 2013. — V.84, №8.
26. Tuchin V. V. *Optical Clearing of Tissues and Blood*. / PM 154, SPIE Press, Bellingham, WA, 2006.
27. Zhu D., Larin K.V., Luo Q., Tuchin V.V. Recent progress in tissue optical clearing // *Laser & Photonics Reviews*. — 2013. — V.7, №5. — P. 732–757.
28. Wang J., Ma N., Shi R., Zhang Y., Yu T., Zhu D. Sugar-induced skin optical clearing: from molecular dynamics simulation to experimental demonstration // *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. — 2014. — V.20, №2.
29. Genina E. A., Bashkatov A. N., Tuchin V. V. Tissue optical immersion clearing // *Expert Review of Medical Devices*. — 2010. — V.7, №6, — P. 825–842.
30. Genina E. A., Bashkatov A. N., Larin K. V., Tuchin V. V. in *Laser Imaging and Manipulation in Cell Biology* / F.S. Pavone. — Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2010. — P.115–164.
31. Nadiarnykh O., Campagnola P.J. in *Second harmonic generation imaging: shg and optical clearing* / F.S. Pavone and P.J. Campagnola. — CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, NY, 2014. — P. 169–189.
32. Тучин В.В. *Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях* / Москва: ФИЗМАТЛИТ, 2010. — 488 с.
33. Тучин В.В. *Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике* / Москва: ФИЗМАТЛИТ, 2012. — 812 с.
34. Sordillo L.A., Pu Y., Pratavieira S., Budansky Y., Alfano R.R. Deep optical imaging of tissue using the second and third near-infrared spectral windows // *Journal of Biomedical Optics* — 2014. — V.19, №5.
35. Shi L., Sordillo L.A., Rodriguez-Contreras A., Alfano R. Transmission in near-infrared optical windows for deep brain imaging // *Journal of Biophotonics*. — 2016. — V.9, №1-2. — P. 38-43.
36. Sordillo D.C., Sordillo L.A., Sordillo P.P., Alfano R.R. Fourth Near-Infrared Optical Window for Assessment of Bone and other Tissues // *Proceedings of SPIE*. — 2016. — V.9689.
37. Bohren C. F., Huffman D. R. *Absorption and scattering of light by small particles* / John Willey & Sons Inc., New York, 1983. — 530 p.
38. Van de Hulst H.C. *Light scattering by small particles* / New York: Dover Publications Inc., 1981. — 470 p.

39. Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V. Tissue Optical Properties / Chapter 5 in: Handbook of Biomedical Optics / D.A. Boas, C. Pitris, N. Ramanujam. — Taylor & Francis Group, LLC, CRC Press Inc., 2011. — P. 67-100.
40. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия / М.: Медицина, 1998. — 704 с.
41. Igarashi T., Nishino K., Nayar S.K. The appearance of human skin: a survey // Foundations and Trends® in Computer Graphics and Vision. — 2007. — V.3, №1. — P. 1-95.
42. Кожа (строение, функция, общая патология и терапия) / А.М. Чернуха, Е.П. Фролова, М.: Медицина, 1982.
43. Quondamatteo F. Skin and diabetes mellitus: what do we know? // Cell and Tissue Research. —2014. — V.355, №1.
44. Simpson C.L., Patel D.M., Green K.J. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis // Nature Reviews Molecular Cell Biology. — 2011. — V.12, №9. — P.565–580.
45. Farage M.A., Miller K.W., Elsner P., Maibach H.I. Structural characteristics of the aging skin: a review // Cutaneous and Ocular Toxicology. — 2007. — V. 26, №4. — P. 343-357.
46. Федюкович Н.И. Анатомия и физиология человека / Ростов н/Дон: «Феникс», 2003. — 416 с.
47. Дерматовенерология. Национальное руководство / Ю.К. Скрипкин, Ю.С. Бутов, О.Л.Иванов. М: ГЭОТАР-Медия, 2013. — 1024 с.
48. Страйер Л., Биохимия, Москва: «Мир», 1984.
49. Linares H.A., Kischer C.W., Dobrkovsky M., Larson D.L. The histiotypic organization of the hypertrophic scar in humans // Journal of Investigative Dermatology. — 1972. — V.59, №4. — P.323–331.
50. Liu Y., Griffith M., Watsky M.A., Forrester J.V., Kuffova L., Grant D., Merrett K., Carlsson D.J. Properties of porcine and recombinant human collagen matrices for optically clear tissue engineering applications // Biomacromolecules. — 2006 — V.7№6. — P. 1819-1828.
51. Wang X.-J., Milner T.E., Chang M.C., Nelson J.S. Group refractive index measurement of dry and hydrated type I collagen films using optical low-coherence reflectometry // Journal of Biomedical Optics. — 1996. — V.1, №2. — P. 212-216.
52. Leonard D.W., Meek K.M. Refractive indices of the collagen fibrils and extrafibrillar material of the corneal stroma // Biophysical Journal. — 1997. — V.72, №3. — P.1382-1387.
53. Atchison D.A. Optical models for human myopic eyes // Vision research. — 2006. — V.46. — P.2236-2250.
54. Bakaraju R.C., Ehrmann K., Papas E., Ho A. Finite schematic eye models and their accuracy to in-vivo data // Vision research. — 2008. V.48. — P.1681-1694.

55. Chen Y.-C., Jiang C.-J., Yang T.-H., Sun C.-C. Development of a human eye model incorporated with intraocular scattering for visual performance assessment // *Journal of Biomedical Optics*. — 2012. — V.17, №7.
56. Baranoski G.V.G., Dey A., Chen T.F. Assessment the sensitivity of human skin hyperspectral responses to increasing anemia severity levels // *Journal of Biomedical Optics*. — 2015. — V.20, №9.
57. Ding H., Lu J.Q., Wooden W.A., Kragel P.J., Hu X.-H. Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm // *Physics in Medicine and Biology*. — 2006. — V.51, №6. — P.1479-1489,
58. Ding H., Lu J.Q., Jacobs K.M., Hu X.-H. Determination of refractive indices of porcine skin tissues and Intralipid at eight wavelengths between 325 and 1557 nm // *Journal of the Optical Society of America*. — 2005. — V.22, №6. — P. 1151-1157.
59. Oliveira L. M., Carvalho M.I., Nogueira E., Tuchin V.V. The characteristic time of glucose diffusion measured for muscle tissue at optical clearing // *Laser Physics*. — 2013. — V.23, №7.
60. Oliveira L., Carvalho M.I., Nogueira E., Tuchin V.V. Optical measurement of rat muscle samples under treatment with ethylene glycol and glucose // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. — 2013. — V.6, №2.
61. Chung S.H., Cerussi A.E., Merritt S.I., Ruth J., Tromberg B.J. Non-invasive tissue temperature measurements based on quantitative diffuse optical spectroscopy (DOS) of water // *Physics in Medicine & Biology*. — 2010. — V.55, №13. — P.3753–3765.
62. Martin K.A. Direct measurement of moisture in skin by NIR spectroscopy // *Journal of the Chemical Society*. — 1993. — V.44. — P.249–261.
63. Hidenobu A., Mariko E. Non-contact skin moisture measurement based on near-infrared spectroscopy // *Applied Spectroscopy*. — 2004. — V.58 — P. 1439–1446.
64. Li C., Jiang J., Xu K. The variations of water in human tissue under certain compression: studied with diffuse reflectance spectroscopy // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. — 2013. — V.6, №1.
65. Schulz B., Chan D., Backstrom J., Rubhausen M. Spectroscopic ellipsometry on biological materials – investigation of hydration dynamics and structural properties // *Thin Solid Films*. — 2004. — V.455–456. — P. 731–734.
66. Nielsen O. F., Bilde M., Frosch M. Water Activity // *Spectroscopy: An International Journal*. — 2012. — V.27, №5-6. — P. 565–569.
67. Caspers P. J., Lucassen G. W., Puppels G. J. Combined *in vivo* confocal raman spectroscopy and confocal microscopy of human skin // *Biophysical Journal*. — 2003. — V.85, №1. — P.572–580.

68. Nakagawa N., Matsumoto M., Sakai S. *In vivo* measurement of the water content in the dermis by confocal Raman spectroscopy // *Skin Research and Technology*. — 2010. — V.16. — P. 137–141.
69. Ballard P., Leahy D.E., Rowland M. Prediction of *in vivo* tissue distribution from *in vitro* data 1. Experiments with markers of aqueous spaces // *Pharmaceutical Research*. — 2000 V.17, №6. — P. 660–663.
70. Gurjarpadhye A.A., Vogt W.C., Liu Y., Rylander C.G. Effect of localized mechanical indentation on skin water content evaluated using OCT // *International Journal of Biomedical Imaging*. — 2011.
71. Martin K. Direct measurement of moisture in skin by NIR spectroscopy // *Applied Spectroscopy*. — 1998. — V.52, №7. — P. 1001-1007.
72. Woo Y.-A., Ahn J.-W., Chun I.-K., Kim H.-J. development of a method for the determination of human skin moisture using a portable near-infrared system // *Analytical Chemistry*. — 2001. — V.73 — P. 4964-4971.
73. Darvin M.E., Sandhagen C., Koecher W., Sterry W., Lademann J., Meinke M.C., Comparison of two methods for noninvasive determination of carotenoids in human and animal skin: Raman spectroscopy versus reflection spectroscopy // *Journal of Biophotonics*. — 2012. — V.5, №7. — P. 550–558.
74. Schneider W., Bortfeld T., Schlegel W., Correlation between CT numbers and tissue parameters needed for Monte Carlo simulations of clinical dose distributions // *Physics in Medicine & Biology*. — 2000. — V. 45, — P. 459-478.
75. Dua R., Chakraborty S. A novel modeling and simulation technique of photo-thermal interactions between lasers and living biological tissues undergoing multiple changes in phase // *Computers in Biology and Medicine*. — 2005. — V.35, №5. — P. 447-462.
76. Seckel B.R., Doherty S.T., Childs J.J., Smirnov M.Z., Cohen R.H., Altshuler G.B. The role of laser tunnels in laser-assisted lipolysis // *Lasers in Surgery and Medicine*. — 2009. — V.41. — P. 728-737.
77. Sturesson C., Andersson-Engels S. Mathematical modelling of dynamic cooling and pre-heating, used to increase the depth of selective damage to blood vessels in laser treatment of port wine stains // *Physics in Medicine & Biology*. — 1996. — V.41. — P. 413-428.
78. Graaff R., Dassel A. C.M., Koelink M.H., de Mul F. F.M., Aarnoudse J.G., Zijlstra W. G., Optical properties of human dermis *in vitro* and *in vivo* // *Applied Optics*. — 1993. — V. 32. — P. 435–447.
79. Simpson C. R., Kohl M., Essenpreis M., Cope M. Near-infrared optical properties of *ex vivo* human skin and subcutaneous tissues measured using the Monte Carlo inversion technique // *Physics in Medicine & Biology*. — 1998. — V. 43. — P. 2465–2478.

80. Jacques S. L., Alter C.A., Prahl S.A. Angular dependence of the He-Ne laser light scattering by human dermis // *Lasers in the Life Sciences*. — 1987. — V.1. — P. 309–333.
81. Salomatina E., Jiang B., Novak J., Yaroslavsky A.N. Optical properties of normal and cancerous human skin in the visible and near infrared spectral range // *Journal of Biomedical Optics*. — 2006. — V. 11, №6.
82. Huang Y., Meek K.M., Swelling studies on the cornea and sclera: The effects of pH and ionic strength // *Biophysical Journal*. — 1999. — V. 77. — P. 1655-1665.
83. Fischer H., Polikarpov I., Craievich A.F. Average protein density is a molecular-weight-dependent function // *Protein Science*. — 2004. — V.13, — P. 2825-2828.
84. Alexandrov S.A., Zvyagin A.V., Silva K.K.M.B.D., Sampson D.D. Bifocal optical coherence refractometry of turbid media // *Optics Letters*. — 2003. — V.28,№2. — P.117-119.
85. Tearney G.J., Brezinski M.E., Southern J.F., Bouma B.E., Hee M.R., Fujimoto J.G. Determination of the refractive index of highly scattering human tissue by optical coherence tomography // *Optics Letters*. — 1995. — V.20,№21. — P.2258-2260.
86. Knuttel A., Boehlau-Godau M. Spatially confined and temporally resolved refractive index and scattering evaluation in human skin performed with optical coherence tomography // *Journal of Biomedical Optics*. — 2000. — V.5,№1. — P. 83-92.
87. Scheuplein R. J. A survey of some fundamental aspects of the absorption and reflection of light by tissue // *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*. — 1964. — V.15. — P. 111-222.
88. Lai J.-C., Zhang Y.-Y., Li Z.-H., Jiang H.-J., He A.-Z. Complex refractive index measurement of biological tissues by attenuated total reflection ellipsometry // *Applied Optics*. — 2010. — V.49, №16. — P. 3235-3238.
89. Yoshida K., Ohkubo K., Ojima N., Iwata K. Application of the critical angle method to refractive index measurement of human skin *in vivo* under partial contact // *Journal of Biomedical Optics*. — 2013. — V.18, №3.
90. Xie S., Li H., Li B. Measurement of optical penetration depth and refractive index of human tissue // *Chinese Optics Letters*. — 2003. — V.1№1. — P. 44-46.
91. Zysk A.M., Adie S.G., Armstrong J.J., Leigh M.S., Paduch A., Sampson D.D., Nguyen F.T., Boppart S.A. Needle-based refractive index measurement using low-coherence interferometry // *Optics Letters*. — 2007. — V.32, №4. — P. 385-387.
92. Борзяк Э.И., Бочаров В.Я., Сапин М.Р., Сатюкова Г.С., Селин Ю.М., Спиринов Б.А. Анатомия человека: в 2-х томах. Т.2 / М.Р. Сапин, М.: Медицина, 1993, — 560 с.
93. Kahle W., Leonhardt H., Platzer W. *Color Atlas and Textbook of Human Anatomy*. — Third edition. — Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1986.
94. Schwarzmaier H.-J., Yaroslavsky A.N., Terenji A., Willmann S., Yaroslavsky I.V., Kahn T.,

- Changes in the optical properties of laser coagulated and thermally coagulated bovine myocardium // Proceedings of SPIE. — 1998. — V. 3254, — P.361-365.
95. Reinoso R. F., Telfer B. A., Rowland M. Tissue water content in rats measured by dissection // Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.— 1997. —V.38. — P. 87–92.
 96. Oliveira L. M., Carvalho M. I., Nogueira E. M. Tuchin V. V. Diffusion characteristics of ethylene glycol in skeletal muscle // Journal of Biomedical Optics. — 2015. — V.20, №5.
 97. Ma C.-M., Li J.S. Monte Carlo dose calculation for radiotherapy treatment planning: dose to water or dose to medium? / World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7 - 12, 2009, Munich, Germany: V. 25/5 Information and Communication in Medicine, Telemedicine and e-Health, 2009.
 98. Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V. Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues: a review // Journal of Innovative Optical Health Sciences. — 2011. — V.4, №1. — P. 9–38.
 99. Haskell R.C., Carlson F.D., Blank P.S. Form birefringence of muscle // Biophysical Journal.— 1989. — V.56, №2. — P. 401-413.
 100. Roggan A., Dorschel K., Minet O., Wolff D., Muller G. The optical properties of biological tissue in the near infrared wavelength range — review and measurements // Laser-Induced Interstitial Thermotherapy. V.P.M25 / G.M. Müller, A. Roggan. — Bellingham, WA, SPIE Press, 1995. — P.10–44.
 101. Bolin F.P., Preuss L.E., Taylor R.C., Ference R.J. Refractive index of some mammalian tissues using a fiber optic cladding method // Applied Optics. — 1989. — V.28, №12. — P.2297-2303.
 102. Dirckx J.J.J., Kuypers L.S., Decraemer W.F. Refractive index of tissue measured with confocal microscopy Journal of Biomedical Optics.— 2005. —V.10№4.
 103. Sun P., Wang Y. Measurements of optical parameters of phantom solution and bulk animal tissues *in vitro* at 650 nm // Optics & Laser Technology, — 2010. — V. 42. — P.1-7.
 104. Cheng S., Shen H.Y., Zhang G., Huang C.H., Huang X.J. Measurement of the refractive index of biotissue at four laser wavelengths // Proceedings of SPIE. — 2002. — V.4916. — P. 172-176.
 105. Li H., Xie S. Measurement method of the refractive index of biotissue by total internal reflection // Applied Optics. — 1996. — V.35, №10. — P.1793-1795.
 106. Lin L., Li H., Xie S. Linear method of determining the refractive index of biotissue // Proceedings of SPIE. — 1999. — V. 3863. — P.177-181.
 107. Li H., Xie S., Lin L. Refractive index of biotissue and its thermal response // Proceedings of SPIE. — 2000. — V.3914. — P.511-516.

- 108.Oliveira L., Lage A., Clemente M.P., Tuchin V. Optical characterization and composition of abdominal wall muscle from rat // Optics and Lasers in Engineering. — 2009. — V.47, №6. — P. 667-672.
- 109.Hall G., Jacques S.L., Eliceiri K.W., Campagnola P.J. Goniometric measurements of thick tissue using Monte Carlo simulations to obtain the single scattering anisotropy coefficient // Biomedical Optics Express. — 2012. — V.3, №11. — P. 2707-2719.
- 110.Douplik A., Saiko G., Schelkanova I., Tuchin V. V. The response of tissue to laser light // Chapter 2 in Lasers for medical application / H. Jelinkova, Woodhead Publishing, 2012.
- 111.Millar S. J., Moss B. W., Stevenson M. H., Some Observations on the Absorption Spectra of Various Myoglobin Derivatives Found in Meat // Meat Science. — 1996.— V.42, №3. — P.277-288.
- 112.Hardman K.D., Eylar E.H., Ray D.K., Banaszak L.J., Curd F.R.N. Isolation of sperm whale myoglobin by low temperature fractionation with ethanol and metallic ions // The journal of biological chemistry. — 1966. —V. 241, No. 2.
- 113.Frotscher M., Kahle W. Color Atlas and Textbook of Human Anatomy. — Sixth edition. — Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2010.
- 114.Sankaran V., Maitland D.J., Walsh J.T. (Jr.), Polarized light propagation in turbid media // Proceedings of SPIE. — 1999. — V.3598. — P.158-165.
- 115.Rhodin J.A.G., Histology. A Text and Atlas, Oxford University Press, New York, 1974.
- 116.Bosman S. Heat-induced structural alterations in myocardium in relation to changing optical properties // Applied Optics. — 1993. — V.32, №4. — P.461-463.
- 117.Kessel R.G., Basic Medical Histology: The Biology of Cells, Tissues and Organs // Oxford University Press, New York, 1998.
- 118.Рощина А.А., Николаева С.С., Кожура В.Л., Быков В.А., Яковлева Л.В., Новодержкина И.С., Королева О.А., Ребров Л.Б., Паршина Е.Ю., Кирсанова А.К., Закономерности изменения различных форм воды в миокарде и печени крыс при кровопотере и в раннем постреанимационном периоде // Биомедицинская химия. — 2003. — Т. 49, №5. — С.451-455.
- 119.Yipintsoi T., Scanlon P. D., Bassingthwaighte J. B. Density and Water Content of Dog Ventricular Myocardium // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. — 1972. — V.141, №3. — P.1032–1035.
- 120.Gardner D. G., Shoback D. M. Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology. — 9th ed. — NY: McGraw-Hill Medical, 2011.
- 121.Diabetes Fact Sheet №312. [Электронный ресурс]. World Health Organization, 2013. — Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>

122. RSSDI Textbook of Diabetes Mellitus / Tripathy B.B. — 2nd ed., New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2012.
123. Datta N.S., Dutta H.S., Majumder K. Brightness-preserving fuzzy contrast enhancement scheme for the detection and classification of diabetic retinopathy disease // *Journal of Medical Imaging*. — 2016. — V.3, №1.
124. Shah S.A.A., Laude A., Faye I., Tang T.B. Automated microaneurysm detection in diabetic retinopathy using curvelet transform // *Journal of Biomedical Optics*. — 2016. — V.21, №10.
125. Shaw J.E., Sicree R.A., Zimmet P.Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 // *Diabetes research and clinical practice*. — 2010. — 87. — P. 4–14.
126. Dikht N. I., Bucharskaya A. B., Terentyuk G. S., Maslyakova G. N., Matveeva O. V., Navolokin N. A., Khlebtsov N. G., Khlebtsov B. N. Morphological study of the internal organs in rats with alloxan diabetes and transplanted liver tumor after intravenous injection of gold nanorods // *Russian Open Medical Journal*. — 2014. — V.3, №3.
127. Freitas Lima L. C., Andrade Braga V., França Silva M. S., Campos Cruz J., Sousa Santos S. H., Oliveira Monteiro M. M., Moura Balarini C., Adipokines, diabetes and atherosclerosis: an inflammatory association // *Frontiers in Physiology*. — 2015. — V.6.
128. Firdous S., Nawaz M., Ahmed M., Anwar S., Rehman A., Rashid R., Mahmood A., Measurement of diabetic sugar concentration in human blood using Raman spectroscopy // *Laser physics*. — 2012. — V.22, №6. — P. 1090–1094.
129. Guo X. X., Mandelis A., Zinman B. Noninvasive glucose detection in human skin using wavelength modulated differential laser photothermal radiometry // *Biomedical Optics Express*. — 2012. — V.3, №11. — P. 3012–3021.
130. Heo Y.J., Takeuchi S. Towards smart tattoos: implantable biosensors for continuous glucose monitoring // *Advanced Healthcare Materials*. — 2013. — V.2, №1. — P. 43–56.
131. Ghosn M.G., Sudheendran N., Wendt M., Glasser A., Tuchin V.V., Larin K.V. Monitoring of glucose permeability in monkey skin in vivo using Optical Coherence Tomography // *Journal of Biophotonics*. — 2010. — V.3, №1-2. — P.25–33.
132. Bashkatov A.N., E.A. Genina, Yu.P. Sinichkin, V.I. Kochubey, N.A. Lakodina, and V.V. Tuchin, Glucose and mannitol diffusion in human dura mater // *Biophysical Journal*. — 2003.— V.85, №5. — P.3310–3318.
133. Kreft M., Luksic M., Zorec T. M., Prebil M., Zorec R. Diffusion of D-glucose measured in the cytosol of a single astrocyte // *Cellular and Molecular Life Sciences*. — 2012. — V.70, №8. — P.1483–1492.

134. Ghosn M. G., Carbajal E. F., Befrui N. A., Larin K.V. Permeability of Hyperosmotic Agent in Normal and Atherosclerotic Vascular Tissues // *Journal Of Biomedical Optics*. — 2008. — V.13, №1.
135. Guo X., Wu G., Wei H., Deng X., Yang H., Ji Y., He Y., Guo Z., Xie S., Zhong H., Zhao Q., Zhu Z. Quantification of Glucose Diffusion in Human Lung Tissues by Using Fourier Domain Optical Coherence Tomography // *Photochem. & Photobiol.* — 2012. — V.88, №2. — P.311–316.
136. Kleter Q.A., Damen J.J.M., Buijs M.J., Ten Cate J.M. The Maillard reaction in demineralized dentin *in vitro* // *Eur J Oral Sci.* — 1997. — V.105, №3. — P. 278-284.
137. Diabetes: Clinical Science in Practice / R.D.G Leslie, D.C. Robbins, Cambridge University Press, 1995.
138. Wondrak G.T., Roberts M.J., Cervantes-Laurean D., Jacobson M.K., Jacobson E.L. Proteins of the extracellular matrix are sensitizers of photo-oxidative stress in human skin cells // *The Journal of Investigative Dermatology*. — 2003. — V.121, №3. — P.578–586.
139. Ghazaryan A., Omar M., Tserevelakis G. J., Ntziachristos V. Optoacoustic detection of tissue glycation, *Biomedical optics express*. — 2015. — V.6, №9.
140. Lin J., Lin J., Huang Z., Lu P., Wang J., Wang X., Chen R. Raman spectroscopy of human hemoglobin for diabetes detection // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. — 2014. — V.7, №1.
141. Sakai S, Kikuchi K, Satoh J, Tagami H, Inoue S. Functional properties of stratum corneum in patients with diabetes mellitus: similarities to senile xerosis // *British Journal of Dermatology*. — 2005. — V.153, №2. — P.319–323.
142. Sakai S., Endo Y., Ozawa N., Sugawara T., Kusaka A., Sayo T., Tagami H., Inoue S., Characteristics of the epidermis and stratum corneum of hairless mice with experimentally induced diabetes mellitus // *Journal of Investigative Dermatology*. — 2003. — V.120, №1. P.79–85.
143. Park H.Y., Kim H.J., Jung M., Chung C.H., Hasham R., Park C.S., Choi E.H. A long-standing hyperglycaemic condition impairs skin barrier by accelerating skin ageing process // *Clinical and Experimental Dermatology*. — 2011. — V.20, №12. — P. 969–974.
144. Taylor K.R., Costanzo A.E., Jameson J.M. Dysfunctional $\gamma\delta$ T cells contribute to impaired keratinocyte homeostasis in mouse models of obesity // *Journal of Investigative Dermatology*. — 2011. — V.131, №12. — P. 2409–2418.
145. Zakharov P., Talary M.S., Kolm I., Caduff A. Full-field optical coherence tomography for the rapid estimation of epidermal thickness: study of patients with diabetes mellitus type 1 // *Physiological Measurement*. — 2010. — V.31, №2. — P. 193–205.

146. Chen X., Lin W., Lu S., Xie T., Kui G., Shi Y., Zou J., Liu Z., Liao W. Mechanistic study of endogenous skin lesions in diabetic rats // *Experimental Dermatology*. — 2010. — V.19, №12. — P.1088–1095.
147. Bertheim U., Engstorm-Laurent A., Hofer P., Hallgren P., Asplund J., Hellstrom S. Loss of hyaluronan in the basement membrane zone of the skin correlates to the degree of stiff hands in diabetic patients // *Acta Dermato-Venereologica*. — 2002. — V.82, №5. — P.329–334.
148. Tahrani A.A., Zeng W., Sakher J., Piya M.K., Hughes S., Dubb K., Stevens M.J. Cutaneous structural and biochemical correlates of foot complications in high-risk diabetes // *Diabetes Care*. — 2012. — V.35, №9. — P.1913–1918.
149. Raabe H. M., Molsen H., Mlinaric S.-M., Acil Y., Sinnecker G. H. G., Notbohm H., Kruse K., Muller P. K. Biochemical alterations in collagen IV induced by *in vitro* glycation // *Biochemical Journal*. — 1996. — V.319. — P. 699-704.
150. Zhernovaya O. S., Bashkatov A. N., Genina E. A., Tuchin V. V., Meglinski I. V., Churmakov D. Yu., Ritchie L. J., Investigation of glucose-hemoglobin interaction by optical coherence tomography // *Proceedings of SPIE*. — 2007. — V.6535.
151. Higgins P. J., Bunn H. F. Kinetic analysis of the nonenzymatic glycosylation of hemoglobin // *The Journal of Biological Chemistry*. — 1981. — V.256, №10. — P.5204-5208.
152. Andanson J.M., Chan K.L.A., Kazarian S.G. High-throughput spectroscopic imaging applied to permeation through the skin // *Applied Spectroscopy*. — 2009. — V.63, №5. — P. 512-517.
153. Choi M.J., Maibach H.I. Elastic vesicles as topical/transdermal drug delivery systems // *International Journal of Cosmetic Science*. — 2005. — V.27, №4. — P. 211-221.
154. Akhtar N. Vesicles: a recently developed novel carrier for enhanced topical drug delivery // *Current Drug Delivery*. — 2014. — V.11, №1. — P. 87-97.
155. Genina E.A., Bashkatov A.N., Tuchin V.V. Study of diffusion of indocyanine green as a photodynamic dye into skin using backscattering spectroscopy // *Quantum Electronics*. — 2014. — V.44, №7. — P. 689-695.
156. Choonara Y.E., Pillay V., Danckwerts M.P., Carmichael T.R., du Toit L.C. A review of implantable intravitreal drug delivery technologies for the treatment of posterior segment eye diseases // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. — 2010. — V.99, №5. — P. 2219-2239.
157. Genina E.A., Bashkatov A.N., Tuchin V.V. Effect of ethanol on the transport of methylene blue through stratum corneum // *Medical Laser Application*. — 2008. — V.23, №1. — P.31-38.
158. Cu Y., Saltzman W.M. Mathematical modeling of molecular diffusion through mucus // *Advanced Drug Delivery Reviews*. — 2009. — V.61, №2. — P. 101-114.

- 159.Lahjomri F., Benamar N., Chatri E., Leblanc R.M. Study of the diffusion of some emulsions in the human skin by pulsed photoacoustic spectroscopy // *Physics in Medicine and Biology*. — 2003. — V.48, №16. — P.2729-2738.
- 160.Prausnitz M.R., Mitragotri S., Langer R. Current status and future potential of transdermal drug delivery // *Nature Reviews: Drug Discovery*. — 2004. — V.3, №2. — P.115-124.
- 161.Notman R., Anwar J. Breaching the skin barrier - insights from molecular simulation of model membranes // *Advanced Drug Delivery Reviews*. — 2013. — V.65, № 2. — P. 237-250.
- 162.Williams A.C., Barry B.W. Penetration enhancers // *Advanced Drug Delivery Reviews*. — 2012. — V.64. — P. 128-137.
- 163.Bachhav Y.G., Summer S., Heinrich A., Bragagna T., Bohler C., Kalia Y.N. Effect of controlled laser microporation on drug transport kinetics into and across the skin // *Journal of Controlled Release*. — 2010. — V.146, №1. — P. 31-36.
- 164.Kolesnikova E.A., Kolesnikov A.S., Genina E.A., Dolotov L.E., Tuchina D.K., Bashkatov A.N., Tuchin V.V. Use of fractional laser microablation of skin for improvement of its immersion clearing // *Proceedings of SPIE*. — 2013. — V.8699.
- 165.Deng Z., Jing L., Wu N., Iv P., Jiang X., Ren Q., Li C. Viscous optical clearing agent for *in vivo* optical imaging // *Journal of Biomedical Optics*. — 2014. — V.19, №7.
- 166.Zhao Q., Li L., Li Q., Jiang X., Ren Q., Chai X., Zhou C. Concentration dependence of optical clearing on the enhancement of laser-scanning optical-resolution photoacoustic microscopy imaging // *Journal of Biomedical Optics*. — 2014. — V.19, №3.
- 167.Genina E.A., Bashkatov A.N., Sinichkin Yu.P., Tuchin V.V. Optical clearing of the eye sclera *in vivo* caused by glucose // *Quantum Electronics*. — 2006. — V.36, №1. — P.1119-1124.
- 168.Kinnunen M., Myllyla R., Vainio S. Detecting glucose-induced changes in *in vitro* and *in vivo* experiments with optical coherence tomography // *Journal of Biomedical Optics*. — 2008. — V.13, №2.
- 169.Zhong H. Q., Guo Z. Y., Wei H. J., Zeng C. C., Xiong H. L., He Y. H., Liu S. H. Quantification of glycerol diffusion in human normal and cancer breast tissues *in vitro* with optical coherence tomography // *Laser Physics Letters*. — 2010. — V.7, №4. — P.315–320.
- 170.Zhao Q.L., Si J.L., Guo Z.Y., Wei H.J., Yang H.Q., Wu G.Y., Xie S.S., Li X.Y., Guo X., Zhong H.Q., Li L.Q. Quantifying glucose permeability and enhanced light penetration in *ex vivo* human normal and cancerous esophagus tissues with optical coherence tomography // *Laser Physics Letters*. — 2011. — V.8, №1. — P. 71-77.
- 171.Wei H. J., Wu G, Guo Z., Yang H., He Y., Xie S., Guo X. Assessment of the effects of ultrasound mediated glucose on permeability of normal, benign, and cancerous human lung tissues with the

- Fourier-domain optical coherence tomography // Journal of Biomedical Optics. — 2012. — V.17, №11.
172. Guo X., Guo Z., Wei H., Yang H., He Y., Xie S., Wu G., Deng X., Zhao Q., Li L. *In vivo* comparison of the optical clearing efficacy of optical clearing agents in human skin by quantifying permeability using optical coherence tomography // Photochemistry and Photobiology. — 2011. — V.87, №3. — P. 734-740.
173. Naegel A., Heisig M., Wittum G. Detailed modeling of skin penetration - an overview // Advanced Drug Delivery Reviews. — 2013. — V.65, №2. — P.191-207.
174. Chen L., Han L., Lian G. Recent advances in predicting skin permeability of hydrophilic solutes // Advanced Drug Delivery Reviews. — 2013. — V.65, №2. — P. 295-305.
175. Anissimov Yu.G., Jepps O.G., Dancik Y., Roberts M.S. Mathematical and pharmacokinetic modelling of epidermal and dermal transport processes // Advanced Drug Delivery Reviews. — 2013. — V.65, №2. — P.169-190.
176. Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт / М.: Мир, 1980. — 341 с.
177. Стась Н.Ф., Свинцова Л.Д. Химия растворов / Томск: Изд-во ТПУ, 2006. — 155 с.
178. Рагимов А.А., Щербакова Г.Н., Инфузионно-трансфузионная терапия: руководство. / М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 240 с.
179. Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований: учебное пособие / М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 976 с.
180. Эткинс П. Физическая химия. Т. 1 / М.: Мир, 1980. — 580 с.
181. Calve S., Ready A., Huppenbauer C., Main R., Neu C. P. Optical clearing in dense connective tissues to visualize cellular connectivity *in situ* // PLoS ONE. — 2015. — V.10, №1.
182. Lambers H., Piessens S., Bloem A., Pronk H., Finkel P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora // International Journal of Cosmetic Science. — 2006. — V.28, №5. — P.359-370.
183. Burry J.S., Coulson H.F., Esser I., Marti V., Melling S.J., Rawlings A.V., Roberts G., Mills A.K. Erroneous gender differences in axillary skin surface/sweat pH // International Journal of Cosmetic Science. — 2001. — V.23. — P. 99-107.
184. Burry J.S., Coulson H.F., Roberts G. Circadian rhythms in axillary skin surface pH // International Journal of Cosmetic Science. — 2001. — V.23, №4. — P. 207-210.
185. Chikakane K., Takahashi H. Measurement of skin pH and its significance in cutaneous diseases // Clinics in Dermatology. — 1995. — V.13. — P.299-306.
186. Ehlers C., Ivens U.I., Moller M.L., Senderovitz T., Serup J. Females have lower skin surface pH than men // Skin Research and Technology. — 2001. — V.7, №2. — P. 90-94.

187. Luebberding S., Krueger N., Kerscher M. Skin physiology in men and women: *in vivo* evaluation of 300 people including TEWL, SC hydration, sebum content and skin surface pH // *International Journal of Cosmetic Science*. — 2013. — V.35, № 5. — P. 477-483.
188. Wa C.V., Maibach H.I. Mapping the human face: biophysical properties // *Skin Research and Technology*. — 2010. — V.16, №1. — P. 38-54.
189. Waller J.M., Maibach H.I. Age and skin structure and function, a quantitative approach (I): blood flow, pH, thickness, and ultrasound echogenicity // *Skin Research and Technology*. — 2005. — V.11, №4. — P. 221-235.
190. Youn S.H., Choi C.W., Choi J.W., Youn S.W. The skin pH and its different influence on the development of acne lesion according to gender and age // *Skin Research and Technology*. — 2013. — V. 19, №2. — P. 131-136.
191. Равич-Щербо М.И., Новиков В.В. Физическая и коллоидная химия. / М.: Высшая Школа, 1975. — 255 с.
192. Genina E.A., Bashkatov A.N., Korobko A.A., Zubkova E.A., Tuchin V.V., Yaroslavsky I., Altshuler G.B. Optical clearing of human skin: comparative study of permeability and dehydration of intact and photothermally perforated skin // *Journal of Biomedical Optics*. — 2008. — V.13, №2.
193. Zhi Z., Han Z., Luo Q., Zhu D. Improve optical clearing of skin *in vitro* with propylene glycol as a penetration enhancer // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. — 2009. — V.2, №3. — P.269–278.
194. Samatham R., Phillips K.G., Jacques S.L. Assessment of optical clearing agents using reflectance-mode confocal scanning laser microscopy // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. — 2010. — V.3, №3. — P.183–188.
195. Fox A. M., Diven D. G., Sra K., Boretsky A., Poonawalla T., Readinger A., Motamedi M., McNichols R. J. Dermal scatter reduction in human skin: a method using controlled application of glycerol // *Lasers in Surgery and Medicine*. — 2009.— V.41, №4. — P.251–255.
196. Bui A. K., McClure R. A., Chang J., Stoianovici C., Hirshburg J., Yeh A. T., Choi B. Revisiting optical clearing with dimethyl sulfoxide (DMSO) // *Lasers in Surgery and Medicine*. — 2009. — V. 41, №2. — P.142–148.
197. Guo X., Guo Z., Wei H., Yang H., He Y., Xie S., Wu G., Zhong H., Li L., Zhao Q. *In vivo* quantification of propylene glycol, glucose and glycerol diffusion in human skin with optical coherence tomography // *Laser Physics*. — 2010. — V. 20, №9. — P.1849–1855.
198. Zhong H., Guo Z., Wei H., Zeng C., Xiong H., He Y., Liu S. *In vitro* study of ultrasound and different-concentration glycerol-induced changes in human skin optical attenuation assessed with optical coherence tomography // *Journal of Biomedical Optics*. — 2010. — V.15, №3.

199. Yoon J., Park D., Son T., Seo J., Nelson J. S., Jung B. A physical method to enhance transdermal delivery of a tissue optical clearing agent: combination of microneedling and sonophoresis // *Lasers in Surgery and Medicine*. — 2010. — V.42, №5. — P.412–417.
200. Wen X., Mao Z., Han Z., Tuchin V. V., Zhu D. *In vivo* skin optical clearing by glycerol solutions: mechanism // *Journal of Biophotonics*. — 2010. — V.3, №1. — P. 44–52.
201. Genina E.A., Bashkatov A.N., Sinichkin Yu.P., Yanina I.Yu., Tuchin V.V. Optical clearing of biological tissues: prospects of application in medical diagnostics and phototherapy // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. — 2015. — V.1, №1. — P. 22-58.
202. Cheshire E.C., Malcomson R.D.G., Joseph S., Biggs M.J.B., Adlam D., Ruttly G.N. Optical clearing of the dura mater using glycerol: a reversible process to aid the post-mortem investigation of infant head injury // *Forensic Science, Medicine, and Pathology*. — 2015. — V.11, №3. — P.395–404.
203. Maurice D. M. Clearing media for the eye // *British Journal of Ophthalmology*. — 1987. — V.71. — P.470-472.
204. Tuchin V.V., Anishchenko T. G., Mishin A. A., Soboleva O. V. Control of bovine sclera optical characteristics with various osmolytes // *Proceedings of SPIE*. — 1997. — V.2982.
205. Zhu Z., Wu G., Wei H., Yang H., He Y., Xie S., Zhao Q., Guo X. Investigation of the permeability and optical clearing ability of different analytes in human normal and cancerous breast tissues by spectral domain OCT // *Journal of Biophotonics*. — 2012. — 5(7). — 536–543.
206. Smith R.M., Matiukas A., Zemlin C.W., Pertsov A.M. Nondestructive optical determination of fiber organization in intact myocardial wall // *Microscopy research and technique*. — 2008. — V.71, №7. — P.510–516.
207. Ke M.T., Fujimoto S., Imai T., See DB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction // *Nature neuroscience*. — 2013. — V.16, №8, — P. 1154-1161.
208. Barer R. Spectrophotometry of clarified cell suspensions // *Science*. — 1955. — V.121, №3151. — P.709–715.
209. Бакуткин В.В., Шубочкин Л.П. Увеличение светопропускания склеры и патологически измененной роговицы // *Офтальмологический журнал*. — 1991. — Т.2, — С. 105-107.
210. Tuchin V.V., Maksimova I.L., Zimnyakov D.A., Kon I.L., Mavlutov A.H., Mishin A.A. Light propagation in tissues with controlled optical properties // *Proceedings of SPIE*. — 1996. — V.2925. — P. 118-142.
211. Yu T., Wen X., Tuchin V.V., Luo Q., Zhu D. Quantitative analysis of dehydration in porcine skin for assessing mechanism of optical clearing // *Journal of Biomedical Optics*. — 2011. — V.16, №9.

212. Xu X., Sun C. Ultrasound enhanced skin optical clearing: microstructural changes // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. — 2010. — V.3, №3. — P.189-194.
213. Xu X., Zhu Q. Feasibility of sonophoretic delivery for effective skin optical clearing // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. — 2008. — V.55, №4. — P.1432-1437.
214. Mao Z., Han Z., Wen X., Luo Q., Zhu D. Influence of glycerol with different concentration on skin optical clearing and morphological changes *in vivo* // *Proceedings of SPIE*. — 2009. — V.7278.
215. Mao Z., Ge X., Li E. Comparison of skin optical clearing by different drug delivery method // *Journal of Physics: Conference Series*. — 2011. — V.277, №1.
216. Huang D., Zhang W., Zhong H., Xiong H., Guo X., Guo Z. Optical clearing of porcine skin tissue *in vitro* studied by Raman microspectroscopy // *Journal of Biomedical Optics*. — 2012. — V.17, №1.
217. Son T., Jung B., Cross-evaluation of optimal glycerol concentration to enhance optical tissue clearing efficacy // *Skin Research and Technology*. — 2014. — V.21, №3. — P.327-232.
218. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Синичкин Ю.П., Тучин В.В. Оптическое просветление кожи под действием глицерина: исследования *ex vivo* и *in vivo* // *Оптика и спектроскопия*. — 2010. — Т.109, № 2. — С. 256-263.
219. Galanzha E.I., Tuchin V.V., Solovieva A.V., Stepanova T.V., Luo Q., Cheng H. Skin backreflectance and microvascular system functioning at the action of osmotic agents // *Journal of Physics D: Applied Physics*. — 2003. — V.36, № 14. P.1739–1746.
220. Chen W., Jiang J., Zhang W., Wang R.K., Xu K. Typical application of skin diffusion optical model to quantitative description of tissue optical properties // *Proceedings of SPIE*. — 2009. — V.7176.
221. Choi B., Tsu L., Chen E., Ishak T.S., Iskandar S.M., Chess S., Nelson J.S. Determination of chemical agent optical clearing potential using *in vitro* human skin // *Lasers in surgery and medicine*. — 2005. — V.36, №2. — P. 72-75.
222. Cicchi R., Pavone F.S., Massi D., Sampson D.D. Contrast and depth enhancement in two-photon microscopy of human skin *ex vivo* by use of optical clearing agents // *Optics Express*. — 2005. — V.13, №7. — P. 2337-2344.
223. Moulton K., Lovell F., Williams E., Ryan P., Lay, Jr, D.C., Jansen D., Willard S. Use of glycerol as an optical clearing agent for enhancing photonic transference and detection of *Salmonella typhimurium* through porcine skin // *Journal of Biomedical Optics*. — 2006. — V.11, №5.
224. Rylander C.G., Stumpp O.F., Milner T.E., Kemp N.J., Mendenhall J.M., Diller K.R., Welch A.J. Dehydration mechanism of optical clearing in tissue // *Journal of Biomedical Optics*. — 2006. — V.11, №4.

225. Wang R.K., Xu X., He Y., Elder J.B. Investigation of optical clearing of gastric tissue immersed with hyperosmotic agents // *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. — 2003. — V.9, №2. — P. 234-242.
226. Plotnikov S., Juneja V., Isaacson A.B., Mohler W.A., Campagnola P.J. Optical clearing for improved contrast in second harmonic generation imaging of skeletal muscle // *Biophysical Journal*. — 2006. — V.90, №1. — P. 328-339.
227. Oliveira L., Lage A., Clemente M.P., Tuchin V. Concentration dependence of the optical clearing effect created in muscle immersed in glycerol and ethylene glycol // *Proceedings of SPIE*. — 2007. — V.6535.
228. LaComb R., Nadiarnykh O., Carey S., Campagnola P.J. Quantitative second harmonic generation imaging and modeling of the optical clearing mechanism in striated muscle and tendon // *Journal of Biomedical Optics*. — 2008. — V.13 №2.
229. Trunina N.A., Lychagov V.V., Tuchin V.V. OCT monitoring of diffusion of water and glycerol through tooth dentine in different geometry of wetting // *Proceedings of SPIE*. — 2010. — V.7563.
230. Glycerine Producers Association, Physical properties of glycerine and its solutions, 1963. — 27p.
231. Handbook of pharmaceutical excipients / R.C. Rowe, P.J. Sheskey, M.E. Quinn, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009. — 888 p.
232. Thornit D. N., Sander B., la Cour M., Lund-Andersen H. The Effects of Peroral Glycerol on Plasma Osmolarity in Diabetic Patients and Healthy Individuals // *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. — 2009. — V.105, №5. — P. 289–293.
233. Liu Y., Yang X., Zhu D., Luo Q. Optical clearing agents improve photoacoustic imaging in the optical diffusive regime // *Optics Letters*. — 2013. — V.38, № 20. — P. 4236-4239.
234. Mao Z., Zhu D., Hu Y., Wen X., Han Z. Influence of alcohols on the optical clearing effect of skin *in vitro* // *Journal of Biomedical Optics*. — 2008. — V.13 № 2.
235. Ding Y., Wang J., Fan Z., Wei D., Shi R., Luo Q., Zhu D., Wei X. Signal and depth enhancement for *in vivo* flow cytometer measurement of ear skin by optical clearing agents // *Biomedical Optics Express*. — 2013. — V.4, № 11. — P.2518-2526
236. Zhong H., Guo Z., Wei H., Guo L., Wang C., He Y., Xiong H., Liu S. Synergistic effect of ultrasound and Thiazone - PEG 400 on human skin optical clearing *in vivo* // *Photochemistry and Photobiology*. — 2010. — V. 86. — P.732-737.
237. Genina E.A., Bashkatov A.N., Kolesnikova E.A., Basko M.V., Terentyuk G.S., Tuchin V.V. Optical coherence tomography monitoring of enhanced skin optical clearing in rats *in vivo* // *Journal of Biomedical Optics*. — 2014. — V.19, № 2.

238. Gao J.K., Polyethylene Glycol as an Embedment for Microscopy and Histochemistry / CRC Press, 1993. — 141 p.
239. Jakasa I., Verberk M.M., Esposito M., Bos J.D., Kezic S. Altered penetration of polyethylene glycols into uninvolved skin of atopic dermatitis patients // Journal of Investigative Dermatology. — 2007. — V.127. — P.129-134.
240. Hamalainen K.M., Kontturi K., Auriola S., Murtomaki L., Urtti A. Estimation of pore size and pore density of biomembranes from permeability measurements of polyethylene glycols using an effusion-like approach // Journal of Controlled Release. — 1997. — V.49. — P.97-104.
241. Weng L., Liang S., Zhang L., Zhang X., Xu J. Transport of glucose and poly(ethylene glycol)s in agarose gels studied by the refractive index method // Macromolecules. — 2005. — V. 38, № 12, P.5236-5242.
242. Gursahani H., Riggs-Sauthier J., Pfeiffer J., Lechuga-Ballesteros D., Fishburn C.S. Absorption of polyethylene glycol (PEG) polymers: the effect of PEG size on permeability // Journal of Pharmaceutical Sciences. — 2009. — V.98, № 8. — P.2847-2856.
243. Tsenova V., Stoykova E. Refractive index measurement in human tissue samples // Proceedings of SPIE. — 2003. — V.5226. — P.413-417.
244. Galanzha E., Kokoska M., Shashkov E., Kim J., Tuchin V., Zharov V. *In vivo* fiber photoacoustic detection and photothermal purging of metastasis targeted by nanoparticles in sentinel lymph nodes at single cell level // Journal of Biophotonics. — 2009. — V.2. — P. 528-539.
245. Schultz S.G., Solomon A. K. Determination of the Effective Hydrodynamic Radii of Small Molecules by Viscometry // The Journal of General Physiology. — 1961. — V.44. — P.1189-1199.
246. Amsden B. Solute diffusion within hydrogels. Mechanisms and models // Macromolecules. — 1998. — V.31, №23. — P. 8382-8395.
247. “Sigma-aldrich,” Poly(ethylene glycol)-300 [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/202371?lang=en®ion=RU>
248. “Sigma-aldrich,” Poly(ethylene glycol)-400 [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/202398?lang=en®ion=RU>
249. Schiebener P., Straub J., Sengers J.M.H.L., Gallagher J.S. Refractive index of water and steam as function of wavelength, temperature and density // Journal of Physical and Chemical Reference Data. — 1990. — V.19, № 3. — P.677-717.
250. Money N.P. Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols: Relationship between molecular weight and vapor pressure deficit // Plant Physiology. — 1989. — V.91. — P. 766-769.
251. Culav E.M., Clark C.H., Merrilees M.J. Connective tissue: matrix composition and its relevance to physical therapy // Physical Therapy. — 1999. — V.79. — P. 308-319

252. Малкин А.Я., Чалых А.Е. Диффузия и вязкость полимеров. Методы измерения / М.: Химия, 1979. — 304 с.
253. Чалых А.Е. Диффузия в полимерных системах / М.: Химия, 1987. — 312 с.
254. Башкатов А.Н., Генина Э.А., Долотов Л.Е. и др. Общий биофизический практикум. Биопотоника: учебно-методическое пособие для студентов, обучающихся по специальностям «Медицинская физика», «Биохимическая физика», профилям «Биофизика» и «Медицинская фотоника» направлению 011200 «Физика» / В.В.Тучин. – Саратов: Изд-во Сарат. Ун-та, 2011. — 144 с.
255. Press W.H., Teukolsky S.A., Vetterling W.T., Flannery B.P. Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing / Cambridge University Press, Cambridge, New York, 1992. — 994 p.
256. Тучина Д.К., Генин В.Д., Башкатов А.Н., Генина Э.А., Тучин В.В. Оптическое просветление тканей кожи *ex vivo* под действием полиэтиленгликоля // Оптика и спектроскопия. — 2016. — Т.120, № 1. — С.36-45.
257. Tuchina D.K., Shi R., Bashkatov A.N., Genina E.A., Zhu D., Luo Q., Tuchin V.V. Ex vivo optical measurements of glucose diffusion kinetics in native and diabetic mouse skin // Journal of Biophotonics. — 2015. — V.8, №4. — P. 332-346.
258. Schmitt J. M., Kumar G. Optical scattering properties of soft tissue: a discrete particle model // Applied Optics. — 1998. — V.37, № 13. — P.2788-2797.
259. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Козинцева М.Д., Тучин В.В. ОКТ-исследование оптического просветления мышечной ткани *in vitro* с помощью 40%-ного раствора глюкозы // Оптика и спектроскопия. — 2016. — Т.120, №1. — С. 27–35.
260. Molteni C., Parrinello M. Glucose in aqueous solution by first principles molecular dynamics // Journal of the American Chemical Society. — 1998. — V.120. — P.2168-2171.
261. Garrido L., Wedeen V.J., Kwong K.K., Spencer U.M., Kantor H.L. Anisotropy of water diffusion in the myocardium of the rat // Circulation Research. — 1994. — V.74. № 5. — P.789-793.
262. Johansson L., Skantze U., Lofroth J.-E. Diffusion and interaction in gels and solutions. 2. experimental results on the obstruction effect // Macromolecules. — 1991. — V.24. — P.6019-6023.
263. Rohilla A., Ali S. Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effects // International journal of research in pharmaceutical and biomedical sciences. — 2012. — V.3, №2. — P.819–823.
264. Frontiers of Oral Biology: Glandular Mechanisms of Salivary Secretion / J.R. Garrett, J.Ekström, L.C. Anderson, 1998.
265. Diniz S.F., Amorim F.P.L.G., Cavalcante-Neto F.F., Bocca A.L., Batista A.C., Simm G.E.P.M., Silva T.A. Alloxan-induced diabetes delays repair in a rat model of closed tibial fracture // Brazilian Journal Of Medical and Biological Research. — 2008. — V.41, №5. — P.373-379.

266. Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., Tuchin V.V. Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm // *Journal of Physics D: Applied Physics*. — 2005. — V.38, №15. P.2543–2555.
267. Hanna W., Friesen D., Bombardier C., Gladman D., Hanna A. Pathologic features of diabetic thick skin // *J. Am. Acad. Dermatol.* — 1987. — V.16. — P.546–553.
268. Tanaka S., Avigad G., Brodsky B., Eikenberry E.F. Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen // *Journal of Molecular Biology*. — 1988. — V. 203, №2. — P. 495–505.
269. Mayrovitz H. N., McClymont A., Pandya N. Skin tissue water assessed via tissue dielectric constant measurements in persons with and without *diabetes mellitus* // *Diabetes Technology & Therapeutics*. — 2013. — V.15, №1. — P. 60–65.
270. *Handbook of Chemistry and Physics* / D. R. Lide. — 84th Edition. — CRC Press, 2003.
271. Генина Э. А., Башкатов А. Н., Козинцева М. Д., Тучин В. В. ОКТ-исследование оптического просветления мышечной ткани *in vitro* с помощью 40%-ного раствора глюкозы // *Оптика и спектроскопия*. — 2016. — Т.120, № 1. — С. 27–35.
272. Khan M. H., Choi B., Chess S., Kelly K. M., McCullough J., Nelson J. S. Optical clearing of *in vivo* human skin: implications for light-based diagnostic imaging and therapeutics // *Lasers in Surgery and Medicine*. — 2004. — V.34, №2. — P.83–85.
273. Тучин В.В., Башкатов А.Н., Генина Э.А., Синичкин Ю.П., Лагодина Н.А. *In vivo* исследование динамики иммерсионного просветления кожи человека // *Письма в журнал технической физики*. — 2001. — Т.27, № 12. — С.10-14.
274. Bykov A., Hautala T., Kinnunen M., Popov A., Karhula S., Saarakkala S., Nieminen M. T., Tuchin V., Meglinski I. Imaging of subchondral bone by optical coherence tomography upon optical clearing of articular cartilage // *Journal of Biophotonics*. — 2016. — V.9, №3. — P.270–275.
275. Jepps O.G., Dancik Y., Anissimov Yu.G., Roberts M.S. Modeling the human skin barrier - towards a better understanding of dermal absorption // *Advanced Drug Delivery Reviews*. — 2013. — V.65, №2. — P. 152-168.
276. Alves L.A., Silva J.B.A., Giulietti M. Solubility of D-glucose in water and ethanol/water mixtures // *Journal of Chemical and Engineering Data*. — 2007. — V.52, №6. — P.2166-2170.